

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Caracterización funcional de los factores de transcripción Sk01 y Ph04
en *Candida Albicans***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Verónica Urrialde Redondo

Directores
Rebeca Alonso Monge
Jesús Pla Alonso

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
SKO1 Y PHO4 EN *Candida albicans***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia

VERÓNICA URRIALDE REDONDO

DIRECTORES

DRA. REBECA ALONSO MONGE

DR. JESÚS PLA ALONSO

**D^a. CONCEPCIÓN GIL GARCÍA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

CERTIFICA: Que D^a. VERÓNICA URRIALDE REDONDO ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de la Dra. Rebeca Alonso Monge y del Dr. Jesús Pla Alonso, el trabajo que presenta para optar al Grado de Doctor en Farmacia con el título:

“Caracterización funcional de los factores de transcripción Sko1 y Pho4 en *Candida albicans*”.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2015.

Fdo. Prof. **Dra. Concepción Gil García**

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **ACI2005416001145:** "Interacción entre las rutas de transducción mediadas por quinasas de tipo MAP y la manosilación de proteínas en el hongo patógeno *Candida albicans*".
Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia, acciones integradas 2005-2007.
- **BIO2006-03637:** Rutas de transducción de señal implicadas en la resistencia a estrés oxidativo y nitrosativo en el hongo patógeno *Candida albicans*: aplicaciones en el desarrollo de una vacuna frente a las candidiasis.
Entidad financiadora: Programa Nacional de Biotecnología, Ministerio de Educación y Ciencia 2007-2010.
- **PIM2010EPA-00658:** Human fungal pathogens under oxygen stress: adaptive mechanisms to hypoxia and reactive oxygen species and their consequences for host interaction and therapy.
Entidad financiadora: Proyectos ERA-NET PathoGenoMics 2011-2014.

Así como al contrato con cargo al proyecto:

- **PIM2010EPA-00658:** Human fungal pathogens under oxygen stress: adaptive mechanisms to hypoxia and reactive oxygen species and their consequences for host interaction and therapy. Periodo del contrato: 2013-2014.

AGRADECIMIENTOS

No hay espacio suficiente en este apartado para poder explicar y demostrar toda la gratitud y cariño que siento hacia todas aquellas personas que a lo largo de estos años de tesis me habéis ayudado y motivado.

Jesús, me gustaría agradecerte de una manera muy especial la confianza que has depositado en mí, dándome la oportunidad de aumentar mi formación profesional y mi espíritu investigador. Tus consejos, avisos y recomendaciones, no solo me han guiado a lo largo de estos años sino que lo seguirán haciendo a lo largo de mi trayectoria personal y profesional.

Rebeca, quiero darte las gracias de una forma especial, por tu buen hacer, paciencia y apoyo constante en la realización de esta tesis; especialmente en estos últimos meses, en los que independientemente de fechas y horas siempre has estado dispuesta a ayudarme. En pocas palabras, te tengo que agradecer que hoy haya llegado hasta aquí, y espero que este momento no sea el final del camino, sino un continuar.

Elvira, por tu permanente disposición a ayudarme y apoyarme, y no solo a nivel experimental. Por transmitirme tú entusiasmo demostrándome día a día que esto merece la pena y por incrementar en mí las ganas de seguir en esto muchos más años. Dani, gracias por tu ayuda con los ratones, sin ti una parte importante de esta tesis no hubiese sido posible. Inês, empezamos y acabamos una etapa juntas, hemos sufrido y disfrutado ambas con la tesis, gracias por tu apoyo y cariño. Blanca, un placer enorme haberte conocido y haber compartido contigo estos años. Juan, Tamara, Raquel, Bárbara, gracias a todos por vuestro apoyo y colaboración.

Quiero dar las gracias de una manera especial a todos los que forman parte del Departamento de Microbiología II (profesores, compañeros, técnicos, secretarías,...), tanto por vuestra acogida como por la colaboración, formación y consejos que siempre habéis estado dispuestos a darme. Gracias por el apoyo y cariño, porque todos de un modo u otro habéis participado en esta Tesis.

Por último, quiero agradecer a mis amigos y a mi familia todo el apoyo y cariño recibido, los cuales han sabido entenderme y comprenderme a lo largo de estos años. De manera muy especial quiero agradecer a mis padres por su cariño, comprensión, apoyo y esfuerzo incondicional gracias a los cuales he podido convertir este sueño en realidad.

Y finalmente, **gracias a todos los que de una u otra forma habéis formado parte de esta Tesis.**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	11
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN.....	27
1. <i>Candida albicans</i> : comensal y patógeno	29
A. Epidemiología del género <i>Candida</i>	29
B. Patogenicidad de <i>Candida albicans</i>	31
2. Adaptación de <i>Candida albicans</i> a cambios en las condiciones ambientales	37
A. Adaptabilidad Metabólica	38
B. Respuesta debida al incremento en el pH del medio	41
C. Adaptación al aumento de temperatura	42
D. Respuestas mediadas por rutas MAP quinasas	44
3. Respuesta de <i>Candida albicans</i> frente a estrés oxidativo	49
A. Especies reactivas y sus efectos	49
B. Señalización de la presencia de especies reactivas	51
C. Respuesta y adaptación al estrés oxidativo	53
PLANTEAMIENTO.....	61
RESULTADOS.....	65
1. Caracterización del factor de transcripción Sko1 en <i>C. albicans</i>	67
A. Papel de Sko1 en la respuesta a diferentes tipos de estrés	67
B. Estudio de la función de Sko1 en morfogénesis	87
C. Estudio de mutantes <i>sko1</i> en modelo de colonización en ratón	95
2. Búsqueda y caracterización de factores de transcripción implicados en respuesta a estrés.....	100
A. Identificación de mutantes en FTs sensibles a estrés.....	100
B. Ensayo de virulencia de los mutantes alterados en factores de transcripción en el modelo de <i>Galleria mellonella</i>	103

C. Ensayos de interacción de los mutantes en FTs con células del sistema inmunitario.....	106
D. Estudios de comensalismo en un modelo murino de mutantes en los factores de transcripción seleccionados	108
3. Caracterización funcional del factor de transcripción Pho4 en <i>C. albicans</i>	111
A. Estudio bioinformático de Pho4.....	111
B. Papel del factor de transcripción Pho4 en respuesta a estrés	113
C. Estudio de la relación entre Pho4 y el arsénico	120
D. Relación de Pho4 con el metabolismo oxidativo	141
E. Colonización del mutante <i>pho4</i> en un modelo murino de comensalismo...	150
F. Estudio de la capacidad de colonización del mutante <i>pho4</i> en competición	153
G. Niveles de adhesión <i>ex vivo</i> de <i>sko1</i> y <i>pho4</i>	158
DISCUSIÓN.....	161
1. Sko1 mediador de la respuesta a estrés y represor de la transición levadura-hifa .	164
2. Pho4, un factor de transcripción implicado en el metabolismo oxidativo de <i>C. albicans</i>	172
CONCLUSIONES	181
MATERIALES Y MÉTODOS	185
1. Microorganismos y líneas celulares.....	187
A. Microorganismos.....	187
B. Líneas celulares y condiciones de cultivo	190
2. Técnicas de Biología Molecular, manipulación de DNA y RNA	191
A. Reintegración del factor de transcripción Pho4.....	192
B. Integración del gen <i>CbLUC</i>	193
C. Análisis transcripcional mediante <i>microarrays</i> de DNA.....	194
D. Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa	195
3. Manipulación y análisis de cultivo de microorganismos.....	195

A.	Cultivo de microorganismos y células eucariotas	195
B.	Ensayos de sensibilidad en placa	198
C.	Ensayos de viabilidad por cuantificación de UFCs	200
D.	Ensayos de morfogénesis.....	201
E.	Técnica de microscopía óptica.....	202
F.	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad luciferasa	202
G.	Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi$).....	203
4.	Manipulación de proteínas.....	203
A.	Obtención de extractos proteicos.....	203
B.	Inmunoprecipitación de la proteína Pho4-Myc.....	204
C.	Tratamiento de Pho4-Myc <i>in vitro</i> con fosfatasa alcalina	205
D.	Electroforesis de proteínas y transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	205
E.	Inmunodetección.....	206
5.	Ensayos de interacción con el hospedador	207
A.	Modelo de virulencia <i>Galleria mellonella</i>	207
B.	Ensayo de colonización en modelo de ratón	207
6.	Estadística y soporte informático	209
LISTA DE FIGURAS		211
LISTA DE TABLAS		217
BIBLIOGRAFÍA.....		221
ANEXOS		239
1.	Anexo I: Tablas de la respuesta transcripcional de Sko1	241
2.	Anexo II: Publicaciones generadas a partir de este trabajo.....	249

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

%	Porcentaje	RC	Rojo Congo
μ	Micro	R123	Rodamina 123
μg	Microgramo	RFP	Proteína roja fluorescente
μl	Microlitro	RNA	Ácido ribonucleico
μM	Micromolar	RNS	Especies reactivas de nitrógeno
aa	Aminoácido/s	ROS	Especies reactivas de oxígeno
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
As (III)	Arsenito sódico (NaAsO ₂)		
As (V)	Arseniato sódico (Na ₂ AsO ₄ -H ₇)	SAP	Aspartil proteasa secretada
°C	Grado centígrado	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ca	<i>Candida albicans</i>	SD	<i>Synthetic dextrose</i>
cel/ml	Células por mililitro	SDS	Dodecilsulfato sódico
cm	Centímetro	SHAM	Ácido salicilhidroxilamínico
CW	Blanco de calcoflúor	SLADH	<i>Synthetic low ammonium dextrose histidine</i>
CO ₂	Dióxido de carbono	UFCs	Unidades formadoras de colonias
D.O.	Densidad óptica	Ura-/+	Auxótrofo/Protótrofo para uracilo
DHF	Dihidrofluoresceína diacetato	UV	Ultravioleta
DNA	Ácido desoxirribonucleico	V	Voltios
Dox	Doxiciclina	wt	Cepa silvestre
ej.	Ejemplo	www	World Wide Web
g	Gramo	YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
GFP	Proteína verde fluorescente		
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol		
GSNO	S-nitrosoglutation		
h	Hora/s		
HOG	High osmolarity glicerol		
Kb	Kilo par de bases		
KDa	Kilo Dalton		
l	Litro		
IP	Ioduro de propidio		
M	Molar		
MAP	Proteína activada por Mitógeno		
MAPK	Proteína quinasa de tipo MAP		
MAPKK	Proteína quinasa de una MAPK		
MAPKKK	Proteína quinasa de una MAPKK		
Md	Menadiona		
min.	Minutos		
mg	Miligramo		
ml	Mililitros		
mM	Milimolar		
nm	Nanometros		
NO	Óxido nítrico		
O ₂	Oxígeno		
ORF	Marco abierto de Lectura		
pb	Par/es de base/s		
PBS	Tampon salino fosfato		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
PMNs	Células polimorfonucleares		
Pi	Fosfato inorgánico (KH ₂ PO ₄)		
r.p.m.	Revoluciones por minuto		

RESUMEN

Título

Caracterización funcional de los factores de transcripción Sko1 y Pho4 en *Candida albicans*.

Introducción

Candida albicans es un patógeno oportunista que habita como comensal en las mucosas del ser humano. Este hongo es el responsable de la mayor parte de las infecciones fúngicas que ocurren en individuos inmunocomprometidos. Posee ciertas características que le permiten colonizar, invadir y diseminarse por el hospedador de manera efectiva. Estas características se denominan factores de virulencia y entre ellos se encuentran: la capacidad de adhesión a superficies, el ser capaz de adoptar diferentes morfologías, la secreción de enzimas hidrolíticas y la formación de biopelículas entre otros.

Como patógeno oportunista, es capaz de hacer frente a las diferentes condiciones ambientales que se dan en el hospedador y que van desde diferentes pH, cambios nutricionales, ambientes hiperosmóticos, competencia por el mismo nicho con la microbiota del hospedador, así como resistir y evadir el sistema inmunológico del mismo. La respuesta y adaptación a estos cambios viene dada a través de rutas de transducción de señales. La señal es transmitida hasta el núcleo mediante interacciones proteína-proteína, y finalmente a través de distintos factores de transcripción se lleva a cabo la regulación transcripcional de los genes implicados en dicha respuesta (bien sea por activación o represión de la transcripción).

Objetivos

1. Caracterizar fenotípicamente los mutantes delecionados en *SKO1* y establecer su papel en la respuesta a estrés.
2. Identificar nuevos factores de transcripción con posible implicación en la respuesta a estrés oxidativo.
3. Analizar el posible papel de los factores de transcripción en interacción con el hospedador.

Resultados

1. Caracterización del factor de transcripción Sko1 en *C. albicans*

Para analizar el papel del factor de transcripción Sko1 en *C. albicans*, realizamos un análisis comparativo de la respuesta transcripcional entre la cepa parental y el mutante *sko1* en condiciones normales de crecimiento en laboratorio (YPD líquido a 37°C). En él se muestra como el factor de transcripción Sko1 tiene un papel represor sobre la transcripción de genes relacionados con la virulencia y con la transición levadura-hifa entre otros. El papel represor de Sko1 sobre la filamentación de *C. albicans* se pone de manifiesto, ya que los mutantes *sko1* son capaces de filamentar a 30°C y 5 % de suero. El papel represor de la transición levadura-hifa parece ser independiente de Hog1, ya que los niveles de expresión de los genes de desarrollo hifal *ECE1* y *HWP1*, aumentan en el doble mutante *hog1 sko1* con respecto a los mutantes sencillos *hog1* y *sko1*. El doble mutante *hog1 sko1* presenta además una mayor capacidad de filamentar que los mutantes sencillos.

La respuesta de Sko1 en presencia de agentes oxidantes es complicada, ya que, su comportamiento difiere en función tanto del agente oxidante como de la concentración del mismo. En presencia de peróxido de hidrógeno y de menadiona, el mutante *sko1* es ligeramente más sensible que la cepa parental; sin embargo, el comportamiento del doble mutante es diferente, revirtiendo parcialmente la susceptibilidad del mutante *hog1* en presencia de peróxido de hidrógeno pero no en presencia de menadiona. El estudio transcripcional, sin embargo, determinó que la respuesta transcripcional del mutante *sko1* en presencia de peróxido de hidrógeno es muy similar a la obtenida en la cepa parental, siendo la regulación de la mayor parte de los genes de respuesta a peróxido de hidrógeno independientes de Sko1. Además, observamos como la delección de *SKO1* disminuye los niveles de fosforilación de las MAP quinasas implicadas en la respuesta a peróxido de hidrógeno (Hog1 y Mkc1), lo que indica que Sko1 puede actuar como regulador de estas proteínas. También está implicado en la respuesta frente a compuestos que dañan la pared celular, ya que la delección de *SKO1* confiere sensibilidad a compuestos tales como rojo Congo, blanco de calcoflúor o caspofungina. Esta respuesta parece ser también independiente de Hog1, ya que el doble mutante muestra un fenotipo intermedio siendo más susceptible que el mutante *hog1*.

2. Identificación de nuevos factores de transcripción implicados en estrés oxidativo

Para la búsqueda de nuevos factores de transcripción implicados en estrés oxidativo llevamos a cabo un rastreo de susceptibilidades frente a distintos compuestos oxidantes. Analizamos una colección de 241 mutantes en factores de transcripción, de los cuales once mostraron deficiencias en el crecimiento frente a alguno de los agentes ensayados. De estos, solo dos factores de transcripción (Cap1 y Skn7) habían sido previamente descritos como implicados en este tipo de respuesta, lo que nos sirvió para validar nuestro método de rastreo. De los nueve restantes no identificados anteriormente decidimos caracterizar más a fondo el mutante *pho4*, puesto que era el que presentaba susceptibilidad tanto a compuestos osmoestresantes como oxidantes.

Para llevar a cabo la caracterización de este nuevo factor de transcripción se reintegró una copia ectópica de *PHO4* en el mutante *pho4*. El factor de transcripción Pho4 está implicado en la respuesta al crecimiento en medios deplecionados en fosfato, como se demuestra de la incapacidad de crecimiento por parte del mutante *pho4* en dichas condiciones. Además, está implicado en la respuesta tanto a estrés osmótico como oxidativo y nitrosativo, ya que la delección de *PHO4* afecta al crecimiento en presencia de compuestos generadores de este tipo de estrés y la reversión de dicha susceptibilidad por parte del reintegrante. Pho4 parece tener relación con las rutas de MAP quinasas, puesto que los patrones de fosforilación de estas se ven alterados, tanto en condiciones basales de crecimiento como en respuesta a los distintos tipos de estrés ensayados.

Dada la similitud estructural entre el fosfato y el arseniato, y dado que Pho4 está implicado en la respuesta a bajo fosfato, analizamos la respuesta de *C. albicans* frente a arseniato y arsenito. La respuesta a arseniato es mediada tanto por Hog1 como Mkc1 ya que ambas MAPK son fosforiladas; a pesar de que ninguno de los mutantes en elementos de estas rutas muestran sensibilidad a este compuesto. Sin embargo, la respuesta a arsenito es llevada a cabo solo a través de Hog1 y de forma independiente de la quinasa Ssk1 y los mutantes en elementos de esta ruta sí que muestran sensibilidades. La respuesta transcripcional a ambos compuestos arsenicales puede ser mediada por el factor de transcripción Pho4, ya que Pho4 es fosforilado en presencia de ambos compuestos y el mutante *pho4* muestra sensibilidades a ambos compuestos. Los niveles de expresión de este factor de transcripción son distintos en función de la presencia o no de fosfato, de

arseniato y de arsenito en el medio, lo que indica que *C. albicans* es capaz de diferenciar dichos compuestos. La capacidad de diferenciar entre los diferentes compuestos se evidencia además por los distintos patrones de fosforilación de las MAPKs en respuesta a estos compuestos.

3. Papel de los factores de transcripción en la interacción con el hospedador

Los resultados obtenidos muestran que tanto Sko1 como Pho4 son prescindibles para la interacción de *C. albicans* con el hospedador. La delección de *SKO1* no afecta para el establecimiento en el tracto gastrointestinal de ratón como comensal; sin embargo, el doble mutante *hog1 sko1* a pesar de ser capaz de establecerse, al contrario que el mutante *hog1*, se acaba perdiendo con el tiempo. Este comportamiento se asemeja al obtenido también en el modelo de infección en *Galleria mellonella*, donde el mutante *sko1* se comporta como una cepa silvestre y el doble mutante es más virulento que el mutante *hog1*. Por su parte, la delección de *PHO4* y a pesar de ser sensible a agentes oxidantes no implica una mayor susceptibilidad frente a células del sistema inmunitario, lo que podría relacionarse con la reversión de los fenotipos que se observa en las condiciones de incubación en los ensayos de interacción (37°C y 5% CO₂). Además el mutante *pho4* se establece como comensal con unos niveles de colonización parecidos a la cepa silvestre. Sin embargo, en ensayos de competición en los que dos cepas (parental y mutante) son inoculadas al mismo tiempo, el mutante *pho4* se establece a niveles inferiores que la cepa parental y acaba perdiéndose con el tiempo. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de adecuación biológica, en los que observamos como el mutante *pho4* acaba perdiéndose cuando se incuban en medio líquido en un cultivo mixto con la cepa silvestre.

Conclusiones

1. El factor de transcripción Sko1 de *C. albicans* es un represor transcripcional de genes involucrados en virulencia y desarrollo hifal en condiciones de cultivo estándar en el laboratorio. Sko1 está involucrado en la respuesta transcripcional frente a estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno, como se deduce de los patrones de sensibilidad a agentes y los estudios transcriptómicos. Igualmente, actúa como un represor de la transición levadura-hifa mediante mecanismos que parecen ser independientes de la MAP quinasa Hog1 y de la ruta mediada por PKA-cAMP.

2. Sko1 no parece ser relevante para la adhesión a la mucosa intestinal de ratón ni para la colonización del tracto gastrointestinal de ratón por *C. albicans*. Tampoco parece ser relevante en la virulencia de *C. albicans* en el modelo de infección en *Galleria mellonella*.
3. Se han identificado los factores de transcripción Ada2, Glo3, Mig1, Pho4, Orf19.2260, Rlm1 Upc2, Wor3 y Zcf31 como mediadores de la respuesta frente a estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno, menadiona o diamida.
4. El factor de transcripción Pho4 está implicado en la regulación del metabolismo oxidativo y en la respuesta a estrés osmótico, oxidativo y nitrosativo en *C. albicans*, según se deduce de su sensibilidad a compuestos inhibidores de la cadena respiratoria y agentes generadores de estrés.
5. Pho4 no es relevante para la virulencia de *C. albicans* en el modelo de infección en *Galleria mellonella*. Sin embargo, es un factor importante en la adhesión de esta levadura a la mucosa intestinal y permite alcanzar niveles altos de colonización, como se deduce de ensayos de competición en presencia de una cepa silvestre.
6. *C. albicans* es capaz de diferenciar el arseniato del fosfato, como se deduce del distinto patrón de fosforilación de MAPKs en presencia de estos compuestos. La ruta HOG media respuesta a arseniato y arsenito en *C. albicans*, siendo la respuesta a arsenito independiente de la proteína reguladora Ssk1.

SUMMARY

Title

Functional characterization of the transcription factors Sko1 and Pho4 in *Candida albicans*.

Introduction

Candida albicans is an opportunist pathogen that lives as a commensal in the gastrointestinal and vaginal niches in humans. This fungus is responsible for the majority of fungal infections arising in immuno-compromised individuals and presents certain traits (virulence factors) that enable the efficient colonization, invasion and spread through the host. These include, among others, the ability to adhere to surfaces, to adopt different morphologies (polymorphism), the secretion of hydrolytic enzymes and the formation of biofilms.

As an opportunistic pathogen *C. albicans* is able to cope with different environmental conditions found in the host (such as nutritional and pH changes or hyperosmotic environments), compete for the same niche with the host microbiota, and resist and evade the host immune system. The response and adaptation to these changes is mediated by different signal transduction pathways that ultimately lead to a transcriptional response that modulates the expression of different target genes.

Objectives

1. Characterize phenotypically the mutants deleted in *SKO1* and establish the role of this gene in the response to stress.
2. Identify new transcription factors with a putative role in the oxidative stress response.
3. Analyse the role of the identified transcription factors in the interaction between *C. albicans* and the host.

Results

1. Functional characterization of Sko1 in *C. albicans*

To analyse the role of the transcription factor Sko1 in *C. albicans*, we performed a comparative analysis of the transcriptional response in the parental strain and the *sko1* mutant under normal growing laboratory conditions (liquid YPD at 37°C). This analysis showed that Sko1 plays a repressive role on the transcription of different virulence-related

Summary

and yeast-to-hypha transition genes. The repressive role of Sko1 on *C. albicans* filamentation is evident under some conditions, as the *sko1* mutants are able to filament at 30°C and 5 % serum. The repressive role of the yeast-to-hypha transition appears to be independent of Hog1 since the levels of *ECE1* and *HWP1* (genes highly expressed in hypha) increase in the double mutant *hog1 sko1* compared to *sko1* and *hog1* single mutants. In addition, the double *hog1 sko1* mutant also displays an enhanced ability to filament compared to the single mutants.

The analysis of the role of Sko1 in the response to oxidative agents was complicated as the behaviour of *sko1* mutants was different depending on both the oxidant agent and the concentration used. In the presence of hydrogen peroxide and menadione, *sko1* mutants were slightly more sensitive than the parental strain. However, the behaviour of the double mutant was different depending on the oxidant analysed: in the presence of hydrogen peroxide, *hog1 sko1* double mutants partially reverted *hog1* mutant susceptibility but this did not occur in the presence of menadione. A genome wide transcriptional study, however, established that the transcriptional response of *sko1* mutants in the presence of hydrogen peroxide is very similar to that obtained in the parental strain, being the regulation of most of the genes responsive to hydrogen peroxide independent of Sko1. In addition, we observed that deletion of *SKO1* decreases the levels of phosphorylation of the MAP kinases involved in the response to hydrogen peroxide (Hog1 and Mkc1), indicating that Sko1 can act as a regulator of these proteins. Sko1 is also involved in the response to compounds that impair the cell wall biogenesis, as deletion of *SKO1* confers sensitivity to compounds such as Congo red, calcofluor white or caspofungin. This response appears to be independent of Hog1.

2. Identification of new transcription factors involved in oxidative stress

In order to identify new transcription factors involved in the response to oxidative stress we designed a screening for the identification of mutants in transcription factors susceptible to different oxidative agents. We analysed a collection of 241 transcription factor mutants, and eleven of them showed low growth compared to the parental strain under any of the agents tested. Only two transcription factors (Cap1 and Skn7) out of eleven had been previously involved in this type of response, which helped us to validate our screening

strategy. From the remaining nine mutants, we decided to characterize the *pho4* mutant, since it showed susceptibility to both osmotic and oxidative stress.

Pho4 is important for growth under phosphate-depleted media. It is also involved in the response to osmotic, oxidative and nitrosative stress, since *PHO4* deletion affects growth in the presence of different stress compounds. Pho4 seems to be related to MAP kinases pathways, because the MAPKs phosphorylation pattern is altered in the presence (and absence) of stress in the *pho4* and reintegrated mutants.

Due to the structural similarity between phosphate and arsenate and the role of Pho4 in the response to low phosphate we analysed the response of *C. albicans* to arsenate and arsenite. The arsenate response is mediated by both Hog1 and Mkc1, since both MAPKs become phosphorylated, although they do not seem to mediate the susceptibility to this compound. However, the response to arsenite is mainly mediated by Hog1 and is independent from the upstream Ssk1-kinase. HOG pathway mutants show enhanced susceptibility to arsenite. The transcriptional response to both arsenic compounds may be mediated by the transcription factor Pho4 because Pho4 is phosphorylated in the presence of both compounds and *pho4* mutant shows sensitivities to both compounds. The expression levels of this gene are different depending on the presence or absence of phosphate, arsenate and arsenite in the medium, indicating that *C. albicans* is able to differentiate between these compounds. This is reinforced by the different MAPKs phosphorylation pattern of wild type and *pho4* mutant cells in response to these compounds.

3. Role of transcription factors in the interaction between *C. albicans* and the host

Our results indicate that both Sko1 and Pho4 are dispensable for the interaction of *C. albicans* with the host. Deletion of *SKO1* does not affect the establishment in the mouse gastrointestinal tract; moreover, a double *hog1 sko1* mutant is able to temporarily establish as commensal, unlike the *hog1* mutant. This behaviour resembles the one obtained in the *Galleria mellonella* infection model, where a *sko1* mutant behaves like a wild type strain and the double mutant is more virulent than the *hog1* mutant. The *pho4* mutants, in spite of being sensitive to oxidative agents do not show higher susceptibility to immune cells. This phenotype could be related to the reversal of the phenotypes observed in the interaction test incubation conditions (37°C and 5 % CO₂). In addition, the *pho4* mutant is able to establish as commensal displaying colonization levels similar to the wild strain. However, in

Summary

competition assays in which two strains (parental and mutant) are simultaneously inoculated, the *pho4* mutant is set at lower levels than the parent strain and disappears with time. This correlates with the results obtained in the assays of fitness (biological adaptation), where a *pho4* mutant was lost when incubated in a mixed culture with the wild strain in liquid medium.

Conclusions

1. The transcription factor Sko1 acts as a transcriptional repressor of genes involved in virulence and hyphal development under standard laboratory culture conditions. Sko1 is involved in the transcriptional response to oxidative stress generated by hydrogen peroxide, as can be deduced from the sensitivity patterns to different oxidative agents and transcriptomic analysis. It also acts as a repressor of the yeast-to-hypha transition through mechanisms that seem to be independent of the HOG and PKA-cAMP pathways.
2. Sko1 does not seem to be relevant neither for adhesion to the mouse intestinal mucosa, nor for the colonization of the murine gastrointestinal tract by *C. albicans*. It does not seem to be relevant for the virulence of *C. albicans* in a *Galleria mellonella* infection model.
3. We have identified the following transcription factors: Ada2, Glo3, Mig1, Pho4, Orf19.2260, Rlm1 Upc2, Wor3 and Zcf31 as mediators of oxidative stress response generated by hydrogen peroxide, diamide or menadione.
4. The transcription factor Pho4 is involved in oxidative metabolism and in response to osmotic, oxidative and nitrosative stress, as deduced from their sensitivity to inhibitors of the respiratory chain and to stress generating agents.
5. Pho4 is not relevant to the virulence of *C. albicans* in a *Galleria mellonella* infection model. However, it is important for the adherence of this yeast to the intestinal mucosa and to achieve high levels of colonization, as deduced from competition assays in the presence of a wild strain.

6. *C. albicans* is able to differentiate arsenate and phosphate, as it is deduced from the different MAPKs phosphorylation pattern in the presence of these compounds. The HOG pathway mediates the response to arsenate and arsenite in *C. albicans* and, the response to arsenite is independent of the regulatory protein Ssk1.

INTRODUCCIÓN

1. *Candida albicans*: comensal y patógeno

En las últimas décadas se ha producido un incremento lento, pero significativo, de las enfermedades fúngicas invasivas. Este hecho se debe en gran medida: a la utilización de antibióticos de amplio espectro, corticoides inmunosupresores y agentes antitumorales, así como al aumento de enfermos sometidos a largas estancias hospitalarias y enfermedades que debilitan el sistema inmunitario (SIDA o VIH). La clínica de las infecciones fúngicas abarca desde las benignas y localizadas (transitorias o crónicas) hasta las diseminadas o sistémicas (micosis invasivas), con frecuencia fatales. Estas micosis invasivas están provocadas generalmente por hongos oportunistas, siendo el género *Candida* el más importante desde el punto de vista cualitativo, ya que aparece en un 75 % de los aislamientos. Le siguen *Aspergillus* con un 12.3 % y *Cryptococcus* con un 4.5 % (Perlroth *et al.*, 2007) siendo la fuente de infección de estos últimos por inhalación o ingesta de las esporas a diferencia del primer género, cuyas infecciones son de origen endógeno al ser algunas especies de este género, como *C. albicans*, comensales habituales del tracto gastrointestinal y genitourinario del ser humano.

A. Epidemiología del género *Candida*

El género *Candida* se clasifica taxonómicamente en: Familia *Saccharomycetaceae*, Orden *Saccharomycetales*, Clase *Ascomycetes*, Subphylum *Ascomycotina*, Phylum *Ascomycota*, Reino *Fungi*. Es un género muy heterogéneo que incluye más de 150 especies, de las cuales tan solo unas cuantas son capaces de provocar enfermedades en los seres humanos (Pfaller *et al.*, 2014; Pfaller and Diekema, 2007). Entre estas especies las patógenas son *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. dublinensis* y *C. glabrata*. Tienen características muy diversas y difieren en su localización pudiéndose encontrar desde objetos inanimados a alimentos o como comensales del ser humano y otros mamíferos, formando parte de la microbiota normal de la orofaringe, intestino, vagina y piel.

Estudios epidemiológicos han determinado que el género *Candida* es el hongo que con mayor prevalencia se aísla de pacientes hospitalizados. Además, este género es el cuarto patógeno que más veces es aislado en pacientes hospitalizados en todo el mundo (20 %). La prevalencia de este patógeno en los aislados de los pacientes no es la misma en

todos los continentes, existiendo una mayor prevalencia en Norte América y Europa (~18 %) y menor en África (11.1 %) y Oceanía (12.7 %) (Vincent *et al.*, 2009; Pfaller and Diekema, 2007).

En España, los datos de distintos estudios muestran un aumento en el número de aislamientos de *Candida* en hemocultivos de pacientes hospitalizados. En el Estudio de Prevalencia de la Infección Nosocomial (EPINE) llevado a cabo entre los años 1990 y 2006 se observa que en esos 17 años el porcentaje de aislamientos de este género aumentó desde el 2.4 % de 1990 al 5.8 % de 2006 (EPINE, 2006). En otro estudio, Vallés y colaboradores (Valles *et al.*, 2008) determinaron que el género *Candida* es la cuarta causa de infecciones de la sangre en pacientes hospitalizados con un 3.7 % de incidencia por detrás de patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*.

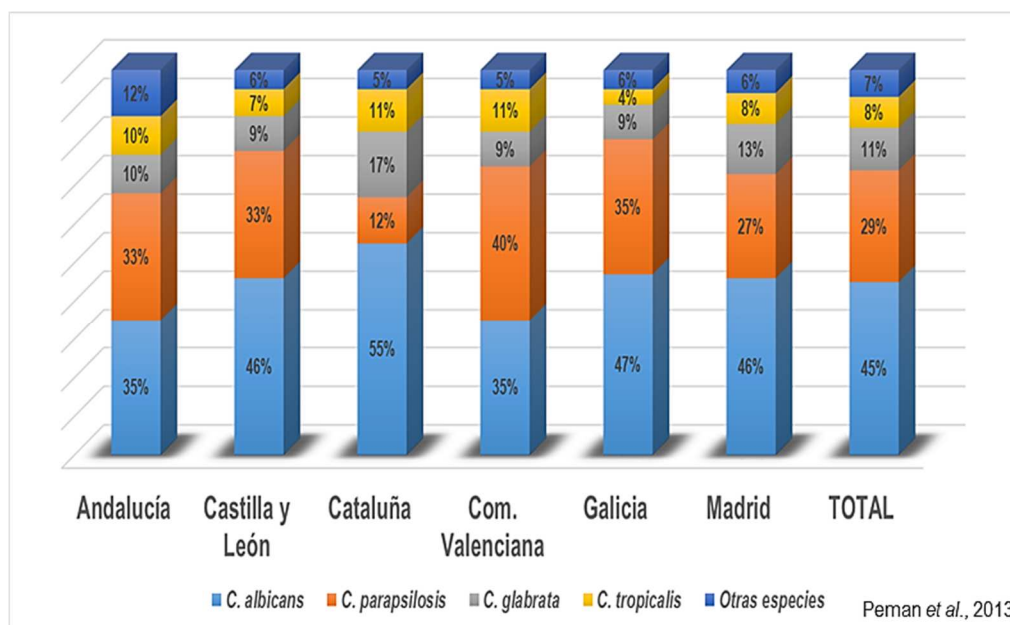


Figura 1. Distribución por comunidades autónomas de las principales especies de *Candida* identificadas en pacientes con fungemia en España.

En el estudio realizado por FUNGEMYCA durante el año 2009 en 43 hospitales de toda España, se determinó que *Candida albicans* es la especie que con mayor frecuencia se aísla en pacientes que sufren fungemia (44.7 %), siguiéndola *C. parapsilosis* (29.1 %), *C. glabrata* (11.5 %), *C. tropicalis* (8.2 %) y *C. krusei* (1.9 %) (Peman *et al.*, 2011). Sin embargo, se observó que esta distribución de porcentajes no es homogénea en nuestro país, existiendo claras diferencias entre las distintas comunidades autónomas (Figura 1).

Otro estudio poblacional más reciente fue el denominado CANDIPOP, organizado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Este estudio fue llevado a cabo en los años 2010 y 2011 en 29 hospitales de cinco provincias españolas (Barcelona, Bilbao, Madrid, Sevilla y Valencia). Se registraron 752 episodios de candidemia en 729 pacientes, por lo que se estimó que la incidencia era de 10.4 episodios/10⁵ habitantes/año (Peman *et al.*, 2013). En este estudio, al igual que en el anterior, *C. albicans* fue la especie que con más frecuencia se aisló (Peman *et al.*, 2013).

B. Patogenicidad de *Candida albicans*

Candida albicans es un comensal patógeno-oportunista del ser humano, que forma parte de la microbiota gastrointestinal, genitourinaria y mucocutánea, y que se encuentra colonizando las mucosas de entre un 30 a un 60 % de la población (Lim *et al.*, 2012). En determinadas circunstancias, cuando el equilibrio que se mantiene entre el sistema inmunológico del hombre y los mecanismos de virulencia del hongo se altera, es capaz de invadir y producir distintos tipos de patologías denominadas candidiasis.

Las patologías producidas pueden ser clasificadas como superficiales o sistémicas. En el caso de las superficiales se ven afectadas la piel, uñas y mucosas, como en el caso la foliculitis, candidiasis vulvovaginal o la candidiasis orofaríngea entre otras. Por el contrario, en las sistémicas, debido a su paso al torrente sanguíneo y posterior diseminación, los que se ven afectados son los distintos órganos internos (riñones, pulmones, cerebro, corazón).

I. Factores de riesgo del hospedador

Existen distintos factores que predisponen al ser humano a sufrir una candidiasis y se pueden clasificar en mecánicos, fisiológicos o iatrogénicos.

- **Mecánicos.** Conllevan una pérdida de continuidad de las barreras epiteliales y de las mucosas debido a quemaduras, abrasiones, uso de prótesis dentales, intervenciones quirúrgicas, etc.
- **Fisiológicos.** Dependen del estado general de salud del ser humano, como edades extremas (mayor riesgo en prematuros y ancianos), malnutrición (déficit de hierro,

hipovitaminosis A y B1), embarazo, menstruación, enfermedades graves (Diabetes mellitus, cáncer, SIDA, neutropenia, estancias prolongadas en Unidades de Cuidados Intensivos, etc.).

- **Iatrogénicos.** Se deben al uso de material médico o tratamientos, tales como catéteres, sondas e intubación, quimioterapia, tratamiento con antibióticos de amplio espectro, tratamiento con inmunosupresores o anticonceptivos entre otros.

II. Factores de virulencia de *Candida albicans*

C. albicans dispone de una serie de características que la permiten colonizar, invadir y diseminarse de una manera efectiva cuando se dan las condiciones adecuadas. Estas características se denominan factores de virulencia y entre ellos, se encuentra su capacidad para adherirse a superficies, su capacidad para adoptar diferentes morfologías (dimorfismo o polimorfismo), la secreción de enzimas hidrolíticas, los cambios morfológicos o *switching* y la formación de biopelículas.

a) Adherencia

El primer paso para la colonización tanto del hospedador como de superficies inanimadas por cualquier microorganismo, es el reconocimiento específico y la posterior adhesión a dichas superficies, por lo que, este primer paso es crucial para la virulencia de la levadura.

En este proceso están implicados mecanismos fisicoquímicos como la hidrofobicidad de la superficie del hongo, la presencia de proteínas específicas denominadas adhesinas y distintos receptores del hospedador (Filler, 2013). Algunas de las proteínas más importantes implicadas en la adherencia de la célula de *C. albicans* a las células del hospedador o a superficies inanimadas se describen a continuación.

- **Als.** Las adhesinas más importantes pertenecen a una familia denominada Als (*Agglutinin-Like-Sequence*) formada por ocho proteínas de pared celular con alta glicosilación (Als1, Als3, Als5, Als6, Als7, Als2, Als4 y Als9). Estas proteínas poseen en su extremo N-terminal, implicado en la unión al ligando, un péptido señal y una región rica en treonina, y en su extremo C-terminal una región rica en serina-treonina y una secuencia que permite el anclaje al glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Murciano *et al.*, 2012). De todas ellas

Als3, es una proteína implicada tanto en la adhesión como en la invasión de las células del hospedador (Liu and Filler, 2011). Se ha descrito que su función es muy importante para la adhesión a células epiteliales de la boca *in vitro* (Wachtler *et al.*, 2011) y del epitelio vaginal *in vivo* (Cheng *et al.*, 2005). Además se ha observado que los mutantes homocigotos para esta proteína muestran una adherencia e invasión de células epiteliales defectuosa, por lo que muestran una capacidad de virulencia menor (Naglik *et al.*, 2011).

- **Hwp1.** Es una manoproteína que se expresa de forma específica en la pared celular de las hifas. Está implicada en la adherencia a células epiteliales, ya que actúa como sustrato para la enzima transglutaminasa del hospedador estableciendo así enlaces covalentes entre las hifas y las células epiteliales (Staab *et al.*, 1999), también está implicada en la formación de biopelículas (Nobile *et al.*, 2006).

- **Eap1.** Proteína de pared celular similar a las adhesinas Als, implicada en la formación de biopelículas, adherencia a poliestireno y células epiteliales (Nobile *et al.*, 2008a).

- **Int1.** Proteína similar a la integrina, se une a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, laminina y colágeno tipo I y IV. La delección del gen que codifica esta proteína genera mutantes defectuosos en la colonización de epitelio intestinal de ratón debido a que se adhieren peor (Kinneberg *et al.*, 1999).

- **Gmp1.** Proteína de la superficie de la levadura, se une a los reguladores del complemento del hospedador como el Factor H, FHL-1 y plasminógeno (Poltermann *et al.*, 2007), así como a la vitronectina. Su unión a la vitronectina permite a la levadura adherirse a las células endoteliales y queratinocitos del hospedador (Lopez *et al.*, 2014).

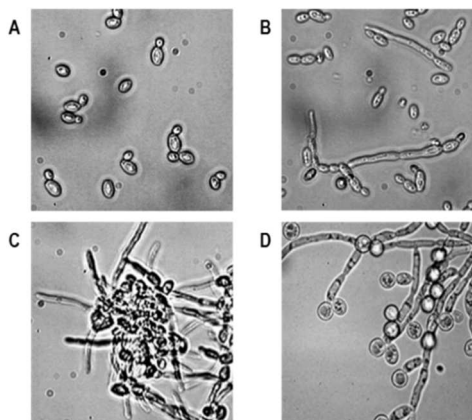
b) Dimorfismo o transición levadura-hifa

C. albicans es un hongo polimórfico que sufre transiciones reversibles y reguladas entre los estados de levadura o blastospora, pseudohifas y crecimiento hifal e incluso en determinadas circunstancias inducir la formación de clamidosporas dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 2).

Figura 2. Polimorfismo de *C. albicans*.

Estados morfológicos llevados a cabo por *C. albicans*.

- (A) Forma levaduriforme o blastosporas.
- (B) Pseudohifas.
- (C) Hifas o forma filamentosa. (Alonso-Monge *et al.*, 2010).
- (D) Clamidosporas



- **Blastosporas o levaduras.** Es la forma unicelular del hongo, de aproximadamente 5 μm de diámetro, se caracteriza por su división celular mediante gemación lo cual implica el crecimiento de nuevo material a partir de un punto en la superficie de la blastospora. La yema va aumentando de tamaño hasta que se produce la división nuclear y celular, formándose entonces un septo entre la célula madre y la célula hija, para acabar dando lugar a otra blastospora idéntica e indistinguible de la célula madre (Soll, 1986).

- **Pseudohifas.** Son células alargadas separadas por septos y con constricciones entre las distintas células. Las nuevas blastosporas permanecen unidas presentando una morfología alargada.

- **Hifas.** Son formas filamentosas alargadas compuestas por múltiples unidades celulares separadas por septos. Formadas a partir de un punto determinado de la blastospora originando un tubo germinativo (típico de *Candida albicans*) que crece continuamente por extensión. Éstas, a su vez pueden formar blastosporas por gemación lateral (Sudbery *et al.*, 2004). El desarrollo hifal se lleva a cabo o se activa por diversas señales y condiciones ambientales, entre las que se encuentra la presencia de suero, N-acetil-D-glucosamina, una temperatura próxima a 37°C, una concentración de CO₂ del 5 o 5.5 %, y un pH ≥ 7 (Sudbery, 2011).

- **Clamidosporas.** Elementos redondeados de pared gruesa formados en los extremos de las hifas y las pseudohifas. Se consideran formas de resistencia que se producen cuando las condiciones son desfavorables como la limitación de nutrientes, bajos niveles de oxígeno o bajas temperaturas (Montazeri and Hedrick, 1984; Dujardin *et al.*, 1980).

Esta habilidad del hongo para cambiar su morfología se ha relacionado con la virulencia de éste, ya que en su forma filamentosa o hifal permitiría la invasión celular (Pukkila-Worley *et al.*, 2009; Berman and Sudbery, 2002) y su forma levaduriforme facilitaría su diseminación a través del torrente sanguíneo (Saville *et al.*, 2003).

c) Secreción de enzimas hidrolíticas

Otro factor implicado en la virulencia de *C. albicans* es la secreción de enzimas hidrolíticas. Esta secreción permite al hongo invadir las células epiteliales, así como la evasión o inactivación de moléculas del sistema inmunológico, y nutrirse de las macromoléculas del hospedador (Schaller *et al.*, 2005). Tres son las familias de enzimas hidrolíticas secretadas: proteasas, lipasas y fosfolipasas.

- **Aspartil proteasas secretadas (SAP).** Es una familia que está compuesta por diez miembros con función carboxil proteasa, cuya expresión viene determinada según el estadio morfológico en el que se encuentre *C. albicans* durante la infección, siendo las encargadas de la actividad proteolítica extracelular. Cuando se encuentra en forma levaduriforme se expresan Sap1, Sap2 y Sap3, en la forma hifal se expresan Sap4, Sap5 y Sap6, mientras que Sap9 y Sap10 se expresan en ambas formas. Sap1-3 están implicadas en el daño tisular, invasión del epitelio oral y de la epidermis, mientras que por su parte Sap4-6 lo están en la infección sistémica siendo secretadas tras la fagocitosis por macrófagos (Naglik *et al.*, 2003).

- **Fosfolipasas.** Se encargan de hidrolizar los grupos éster de los glicerofosfolípidos de las membranas celulares del hospedador facilitando por tanto la invasión. Se ha identificado cuatro fosfolipasas que son Pla, Plb, Plc y Pld. De estas cuatro solo Plb se ha descrito como implicada en la virulencia, concretamente Plb1 y Plb5, ya que sus mutantes muestran una capacidad de virulencia atenuada (Theiss *et al.*, 2006; Leidich *et al.*, 1998).

- **Lipasas.** Están codificadas por una familia de diez genes (*LIP1-LIP10*) y catalizan la hidrólisis de triglicéridos (Hube *et al.*, 2000). Un estudio de Gacser y colaboradores demostró que la lipasa Lip8 está implicada en la virulencia, ya que el mutante *lip8* veía disminuida su capacidad de virulencia en un modelo de infección sistémica en ratón (Gacser *et al.*, 2007).

d) Cambio de fenotipo o *switching*

El cambio de fenotipo o *switching* se ha descrito como una habilidad de *C. albicans* para cambiar de forma espontánea, reversible y en alta frecuencia de fenotipo viéndose reflejado en un cambio en la morfología colonial.

Uno de los cambios fenotípicos más estudiado es el conocido como transición blanca-opaca (*switch white-opaque*) (Slutsky et al., 1987). Este cambio fenotipo está controlado por el locus MTL (Mating Type Locus), mostrando solo aquellas células que sean homocigotas bien MTL a/a o MTL α/α la capacidad para transformarse en células opacas (Soll et al., 2003). Se ha descrito al factor de transcripción Wor1 como un regulador esencial de dicha transición, ya que el mutante *wor1* es incapaz de llevar a cabo la transición a opaca, siendo por tanto todas las células blancas (Huang et al., 2006).

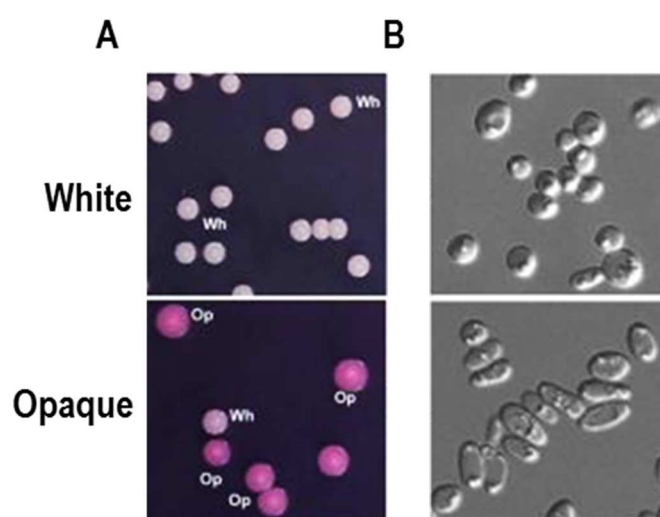


Figura 3. Transición blanca/opaca en *C. albicans*.

Cambio de fenotipo blanca-opaca. (A) Morfología colonial: en que las colonias formadas por células opacas se tiñen con Floxina B apareciendo de color rosa y las colonias de células blancas no. (B) Morfología celular: las células opacas son más alargadas mientras que las células blancas presentan la forma ovalada característica de esta levadura. (Guan et al., 2013).

Existen diferencias morfológicas tanto a nivel colonial como celular. A nivel colonial las diferencias se pueden observar, ya que las colonias formadas por células opacas son capaces de teñirse con Floxina B (color rosado), mientras que aquellas colonias formadas por células blancas no lo son (mostrando por tanto el color blanco característico de *C. albicans*) (Figura 3.A). Por otro lado, a nivel celular también se observan diferencias, las células opacas presentan una morfología más alargadas y con una superficie granulosa,

mientras que las células blancas presentan la forma ovalada característica y una superficie lisa (Figura 3.B). Se ha descrito también que las células opacas y las células blancas tienen distintos niveles de patogenicidad, siendo las opacas menos virulentas en las infecciones sistémicas que las blancas, pero más cuando se trata de infecciones superficiales.

e) Formación de biopelículas

La biopelícula o *biofilm* es una estructura que se encuentra formada por una comunidad de microorganismos que se encuentran unidos de forma irreversible y a su vez embebidos en una matriz extracelular de polisacáridos y proteínas.

Uno de los principales factores de virulencia que posee *C. albicans* es su capacidad para la formación de biopelículas o *biofilms* sobre distintos tipos de superficies como son los catéteres, las prótesis o las células mucosas y epiteliales y su posterior dispersión a partir de ellas (Fanning and Mitchell, 2012; Ganguly and Mitchell, 2011). Esta capacidad de formar biopelículas hace que *C. albicans* sea más patogénica que otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr* cuya capacidad para formarlas es menor (Nikawa *et al.*, 1998). Además la formación de biopelículas permite a las levaduras resistir a la acción de antifúngicos y del sistema inmunológico del hospedador (Xie *et al.*, 2012).

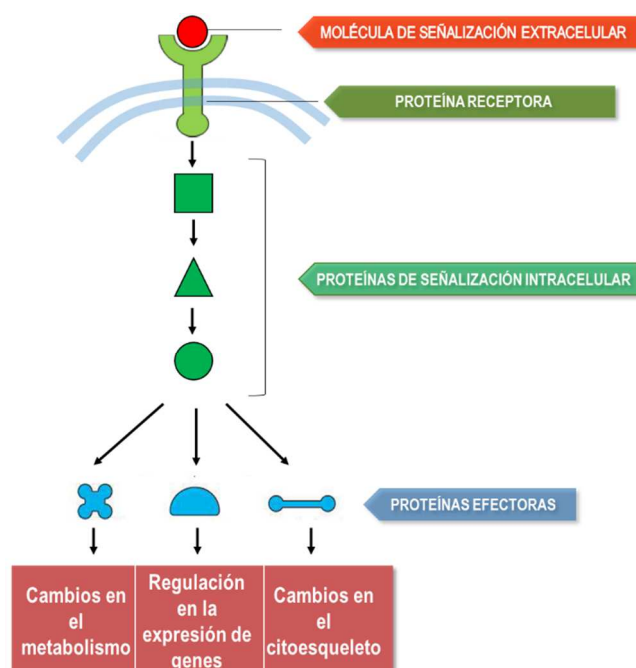
Las biopelículas se forman de manera secuencial, produciéndose en primer lugar la adhesión a la superficie por parte de las levaduras por medio de adhesinas como Eap1. Posteriormente, tiene lugar la proliferación de las levaduras y la formación de los tubos germinales que dan lugar a las hifas, formándose la matriz extracelular y finalmente la dispersión de las levaduras desde la biopelícula (Finkel and Mitchell, 2011).

2. Adaptación de *Candida albicans* a cambios en las condiciones ambientales

Los seres vivos deben de ser capaces de responder y adaptarse a los constantes cambios que se suceden en el medio que los rodea (variaciones en la temperatura, humedad, salinidad, etc.) para así poder sobrevivir. Esta habilidad de adaptación es fundamental para la capacidad de colonización de distintos nichos por cualquier microorganismo y está profundamente implicada en la interacción de esta levadura con el hospedador.

Figura 4. Esquema general de las rutas de transducción de señales.

El estímulo es percibido por una proteína receptora que transmite la señal a una cascada de proteínas de señalización que conducen dicha señal hasta el núcleo donde se va a producir la expresión de genes que darán lugar a las proteínas efectoras que permitirán responder a dicho estímulo.



La detección, señalización, respuesta y posterior adaptación a los cambios, es un proceso secuencial denominado transducción de señal (Figura 4). El primer paso es la captación o detección de las señales extracelulares mediante receptores celulares localizados en las membranas plasmáticas. Posteriormente, la señal extracelular es transformada en una señal intracelular que se transmite y se amplifica hasta el núcleo mediante interacciones proteína-proteína. Finalmente, se lleva a cabo la respuesta por la modificación en la actividad de las proteínas y la regulación transcripcional de los genes (bien sea por la activación o represión de su transcripción).

A. Adaptabilidad Metabólica

C. albicans es capaz de variar su metabolismo en función de las diferentes condiciones que encuentra durante su colonización y posterior invasión a través de distintos tejidos para poder diseminarse por órganos diana. Esta adaptabilidad se manifiesta desde el empleo de distintas rutas metabólicas para la obtención de nutrientes y energía hasta la asimilación de nutrientes del hospedador para su propio beneficio (Brown *et al.*, 2014). La adaptación metabólica afecta a la patogenicidad de *C. albicans* en múltiples niveles, ya que contribuye tanto a su crecimiento de forma directa, como a la resistencia a estrés, remodelación de la pared celular y expresión de factores de virulencia así como a su resistencia frente al sistema inmune innato de manera indirecta (Figura 5).

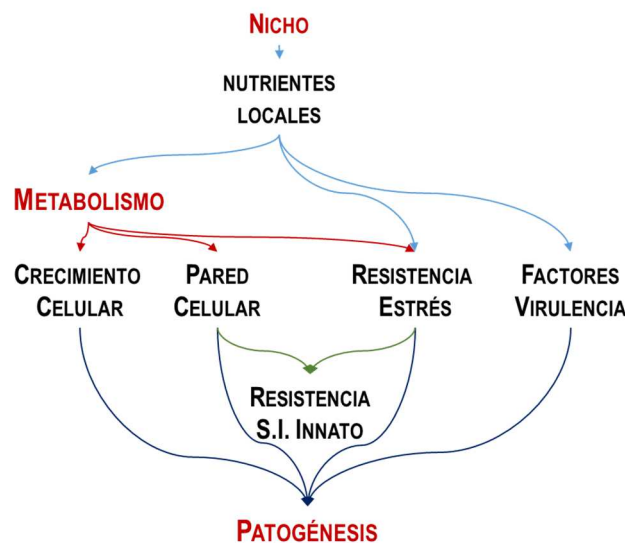


Figura 5. Efectos de los nutrientes sobre la patogénesis de *C. albicans*.

Los nutrientes contribuyen a la patogénesis, ya que afectan tanto a la remodelación de la pared celular y crecimiento celular como a la resistencia a estrés y a la modulación de factores de virulencia (morfogénesis, adhesión, etc.). (Adaptado de (Brown *et al.*, 2014)).

Mientras *C. albicans* se encuentra formando parte de la microbiota del intestino dispone de una alta concentración de nutrientes, aunque tiene que competir por ellos con el resto de la microbiota. Cuando se encuentra diseminada por el torrente sanguíneo la disponibilidad de la glucosa (su principal fuente de carbono y por tanto de energía) es relativamente alta (los niveles de glucosa en sangre se mantienen entre el 0.06 y el 0.1 %, lo que se corresponde con una concentración de entre 3 y 5 mM (Barelle *et al.*, 2006)), por lo que no se observan diferencias entre las rutas del metabolismo de los carbohidratos. En el hígado se produce la glucogenólisis, ya que en este órgano se almacenan grandes cantidades de glucógeno y actúa por tanto como reserva de glucosa. Por el contrario, cuando se encuentra en el cerebro las concentraciones de glucosa son muy escasas, por lo que recurre a otros recursos del hospedador como proteínas, aminoácidos y lípidos (Ene *et al.*, 2012; Fleck *et al.*, 2011).

La inducción de la transición morfológica, levadura-hifa, está relacionada con el metabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos son usados cuando la presencia de glucosa es muy pobre, por lo que la célula se ve obligada a utilizar estos como fuente de carbono. Ello genera exceso de nitrógeno, que es expulsado fuera de la célula en forma de amonio, lo que genera una variación del pH extracelular que favorece el desarrollo de la hifa (Vylkova *et al.*, 2011).

La capacidad de adhesión, formación de biopelículas y secreción de enzimas hidrolíticas se ven también muy afectadas por los cambios producidos en el metabolismo. Una de las adhesinas más estudiadas, Als3, se ha descrito como receptora de la ferritina lo

que facilita a *C. albicans* la adquisición de hierro durante la colonización del hospedador (Liu and Filler, 2011). La secreción de enzimas hidrolíticas, como las seril-proteasas, también se ve afectada, siendo expresada en medios con nitrógeno y con fuentes de carbono. Por ejemplo, los niveles de SAP2 (una serina-proteasa de la familia SAP) son más altos comparados con otras serina-proteasas cuando el medio contiene glicerol respecto de cuando contiene niveles medios de glucosa o galactosa. El metabolismo también tiene que adaptarse con el cambio de fenotipo blanca-opaca de las células, ya que las células blancas poseen activados genes relacionados con el metabolismo glucolítico, mientras que las células opacas tienen regulados aquellos genes cuya función tiene que ver con el metabolismo respiratorio y la β -oxidación de ácidos grasos (Lan *et al.*, 2002).

El metabolismo permite también la adaptación y resistencia frente a estrés y estructura de la pared celular. Durante la respuesta a estrés osmótico y oxidativo se generan metabolitos como el glicerol y antioxidantes como el glutatión y la trehalosa (producidos gracias a la ruta glucolítica) que actúan como protectores (Brown *et al.*, 2014). Se ha descrito que el crecimiento de *C. albicans* en lactosa en lugar de glucosa implica cambios en la estructura de su pared celular, y por tanto, también en su capacidad de respuesta frente al estrés osmótico así como en la viabilidad frente al tratamiento con antifúngicos. También se ha observado que el crecimiento en fuentes de carbono alternativas como fructosa, galactosa, piruvato, lípidos y aminoácidos provocan cambios en la estructura de la pared celular incrementando a su vez la capacidad de virulencia y de respuesta a estrés (Ene *et al.*, 2012).

Además de enfrentarse al estrés oxidativo y nitrosativo generado por los neutrófilos y los macrófagos, cuando las células son fagocitadas también se enfrentan a un ambiente muy pobre en nutrientes. Este hecho provoca que las células fagocitadas sufran un cambio en su metabolismo ya que comienzan a expresar enzimas implicadas en la β -oxidación de los ácidos grasos, en el ciclo del glioxilato y de la gluconeogénesis, además del uso de los aminoácidos de las células inmunes para así poder hacer frente a la falta de nutrientes (Lorenz *et al.*, 2004).

B. Respuesta debida al incremento en el pH del medio

Como comensal del hombre *C. albicans* está presente en zonas del cuerpo donde las condiciones de pH son muy diferentes, siendo capaz de adaptarse tanto a nichos alcalinos como a otros más ácidos. Algunos de estos pH varían desde un pH ácido, como el de la vagina (pH = 4) o incluso más ácido como en el intestino delgado (cerca de 2.5), a un pH más alcalino, como puede ser el de la sangre (pH = 7.4) o el del intestino grueso (pH = 8). La morfología de *C. albicans* varía en función del pH, presentándose fundamentalmente en forma levaduriforme cuando el pH es ácido mientras que la forma predominante cuando el pH es neutro es la forma filamentosa.

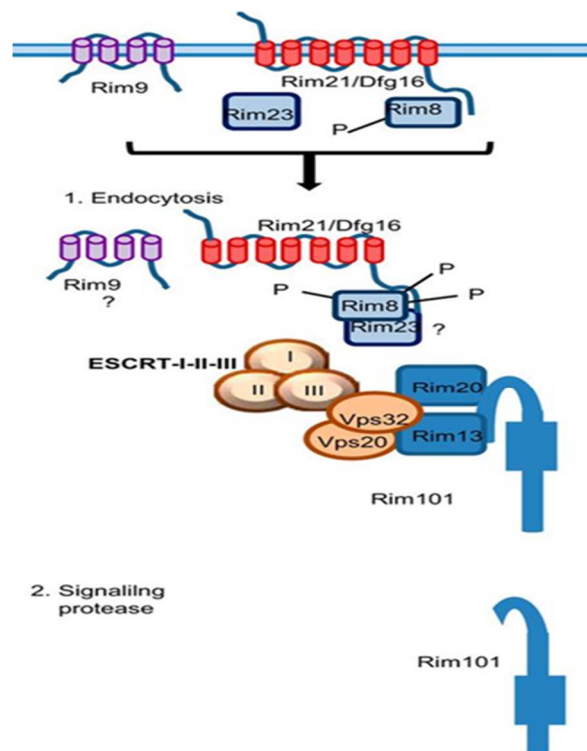


Figura 6. Cascada de señalización de pH en *C. albicans*.

Esquema general de la ruta de señalización que tiene lugar en respuesta a un cambio de pH de neutro a alcalino. La respuesta es mediada a través de la proteólisis del factor de transcripción Rim101 que es translocado al núcleo, este proceso posibilitará la expresión de genes de adaptación al cambio de pH. (Cornet and Gaillardin, 2014)

La ruta que permite percibir el cambio de un pH neutro a un pH alcalino está muy conservada dentro del reino de los hongos. En *C. albicans* la ruta está mediada por el factor de transcripción Rim101 (Figura 6). El cambio de un pH neutro a un pH alcalino es percibido por un complejo localizado en la membrana plasmática que involucra a los receptores Rim21-Dfg16, Rim9, Rim23 y Rim8. A continuación, el complejo es endocitado debido a la hiperfosforilación de Rim8 por los complejos endosomales formados por ESCRT-I, II y III y por Vps32 y Vps23. Este complejo endosomal junto con la hiperfosforilación de Rim8 permite a Vps32 reclutar a Rim13, Rim20 y Rim101. Cuando el pH cambia de neutro a

alcalino Rim13 media una activación proteolítica de Rim101. Seguidamente Rim101 se transloca al núcleo donde actúa como activador de genes de respuesta a pH alcalino y represor de genes de respuesta a pH ácido (Cornet and Gaillardin, 2014).

Es una ruta que también interviene en el metabolismo y transporte del hierro así como a la transición levadura-hifa, la estructura de la pared celular, la adhesión y la producción de biopelículas. Como se ha comentado en el apartado anterior, el exceso de nitrógeno excretado al exterior de la célula en forma de amonio (producido durante el metabolismo de los aminoácidos) provoca un cambio del pH extracelular. Este cambio de pH detectado por Rim101 induce la filamentación a través del factor de transcripción Efg1 (Liu, 2001). Se ha comprobado también la contribución de esta ruta o de sus elementos tanto en la adquisición de hierro como en la patogénesis de *C. albicans*. Por un lado, la unión de la adhesina Als3 a la ferritina que permite la adquisición de hierro es dependiente de Rim101. Por otro lado, se ha descrito que mutantes defectuosos en *DFG16*, *RIM20* e incluso *RIM101* son menos virulentos en distintos modelos de infección en ratón (Yuan *et al.*, 2010; Nobile *et al.*, 2008b; Thewes *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2000).

C. Adaptación al aumento de temperatura

El aumento brusco de temperatura o choque térmico (cambio de temperatura de 30°C a 42°C) provoca un incorrecto plegamiento de proteínas, un incremento en la fluidez de la membrana plasmática y un deterioro de las moléculas de RNA (Leach and Cowen, 2013). Estos efectos en *C. albicans* influyen en el apareamiento (*mating*), el cambio fenotípico (*switching*), la resistencia a antifúngicos así como en la transición morfológica levadura-hifa. Por tanto, la capacidad de percibir y responder frente al cambio de temperatura es esencial para su adaptación como comensal y para la virulencia de *C. albicans*.

La respuesta al estrés producido por calor o choque térmico está regido por el factor de transcripción de choque térmico Hsf1. Este es fosforilado rápidamente e induce la transcripción de genes que codifican *HSP* (*Heat Shock Proteins*, proteínas de choque térmico) gracias a su unión a los promotores de elementos de choque térmico (HSEs) (Figura 7).

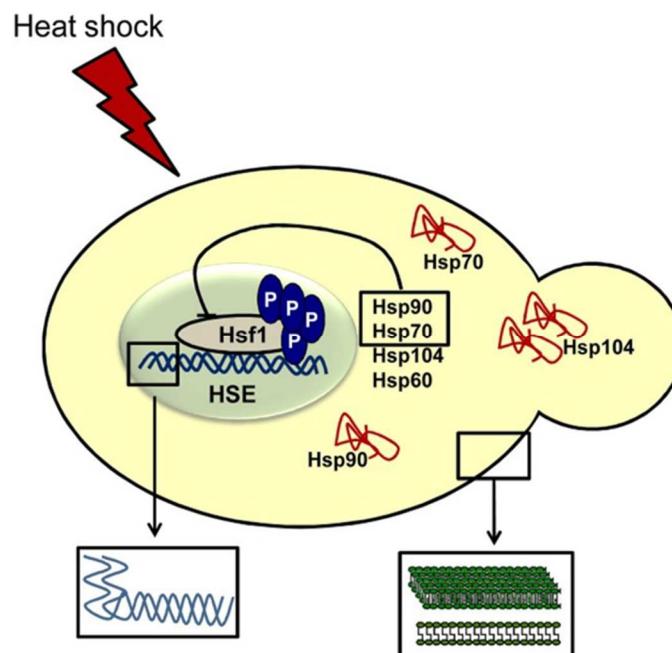


Figura 7. Efectos producidos por el calor y mecanismo de señalización.

Tras producirse el choque térmico entre otros efectos, la membrana plasmática se vuelve más fluida (cuadro abajo a la derecha) y el RNA se deteriora (cuadro abajo a la izquierda). La célula responde a esos daños fosforilando el factor de transcripción Hsf1 que se une a elementos de respuesta a choque térmico (HSE), lo que conduce a la regulación positiva de las chaperonas Hsp90 y Hsp70. (Leach and Cowen, 2013)

Estas proteínas especializadas, Hsp, actúan como chaperonas moleculares o proteínas de choque térmico. Ayudan a la estabilización conformacional de las proteínas, evitando por tanto que estas se desnaturalicen debido a la temperatura. En *C. albicans* se han identificado cuatro familias de Hsp de alto peso molecular y dependientes de ATP que son Hsp100, Hsp90, Hsp70 y Hsp60 (Richter *et al.*, 2010). Los miembros más destacados de estas familias son: Hsp104, requerida para la formación de biopelículas; Hsp78, activada en respuesta a la fagocitosis por macrófagos; Hsp60, que codifica una chaperona mitocondrial; dos proteínas Hsp70 (Ssa1 y Ssa2), localizadas en la superficie celular y actúan como receptores de péptidos antimicrobianos; Hsp90, que regula la resistencia a fármacos, la formación de biopelículas, la morfogénesis y la virulencia.

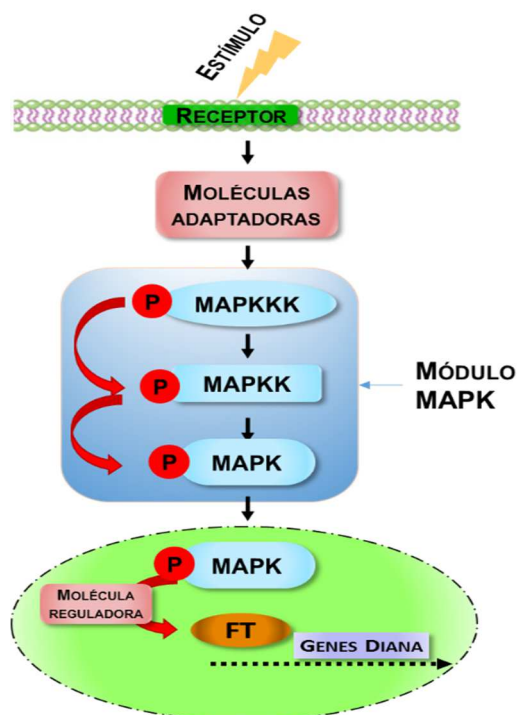
Se han identificado otras cinco familias de Hsp de bajo peso molecular e independientes de ATP y que son: Hsp10, Hsp12, Hsp21, Hsp30 y Hsp31 (Inglis *et al.*, 2012). Entre ellas, las más estudiadas son: Hsp12, que se expresa tanto en respuesta a un choque térmico como en respuesta a estrés oxidativo y Hsp21, que regula los niveles intracelulares de trehalosa (la cual actúa como una “chaperona química”) (Mayer *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que los mutantes *hsf1*, *ssa1* (Hsp70) y *hsp21* son menos virulentos en modelos de candidiasis sistémica en ratón (Mayer *et al.*, 2012; Nicholls *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010).

D. Respuestas mediadas por rutas MAP quinasas

Uno de los sistemas de transducción de señales más conservado en eucariotas es el que implica a las rutas mediadas por las proteínas quinasas activadas por mitógeno o proteínas quinasas de tipo MAP (*Mitogen Activated Protein*) (Cowan and Storey, 2003). Éstas se encuentran altamente conservadas filogenéticamente entre los eucariotas y juegan papeles esenciales en las respuestas frente a factores ambientales, hormonas y factores de crecimiento entre otros. Controlan los procesos de morfogénesis, proliferación y diferenciación celular, la supervivencia e incluso la regulación de la expresión de factores de virulencia en *C. albicans* (Román *et al.*, 2007; Alonso-Monge *et al.*, 2006). El componente fundamental de este tipo de rutas es el módulo de quinasas tipo MAP formado por tres proteínas: la MAP quinasa (MAPKKK o MEKK), la MAP quinasa (MAPKK o MEK) y la MAP quinasa (MAPK o ERK). La transmisión de la señal a través de este módulo se produce a través de fosforilaciones secuenciales de una proteína a otra (Figura 8).

Figura 8. Esquema general de las rutas mediadas por MAP quinasas.

El estímulo es percibido por receptores específicos localizados en la membrana plasmática. La señal es transferida al módulo de las MAP quinasas a través de moléculas adaptadoras tipo GTPasa, PKAs o sistema de dos (tres) componentes. En el módulo de MAP quinasas y por fosforilaciones secuenciales la señal es transmitida a través de la MAPKKK a la MAPKK y finalmente a la MAPK. Finalmente la MAPK se transloca al núcleo donde fosforila a un Factor de Transcripción (FT) o una molécula reguladora (represor). Estas proteínas actuarán como activadores o represores de la transcripción de genes diana permitiendo así la adaptación a las nuevas condiciones ambientales. (Figura adaptada de Román *et al.*, 2007)



El desencadenante de la activación de la cascada de MAP quinasas es la percepción de un estímulo a través de un receptor en la membrana plasmática. Este receptor puede ser de varios tipos: receptores acoplados a proteínas G, sensores de fosforilación histidina-aspartico denominados sistemas de dos componentes, receptores de tipo tirosina

quinasa o proteínas integrales de membrana, habiéndose solo identificado los dos primeros en levaduras (Herskowitz, 1995). Seguidamente, y a través de proteínas intermediarias o moléculas adaptadoras, normalmente GTPasas (proteínas G) o proteínas quinasas (PKAs) (Widmann *et al.*, 1999) la señal es conducida al módulo central de las MAP quinasas.

El siguiente paso es la transducción de señales a través del módulo de las MAP quinasas. La MAPKKK posee un dominio catalítico en su región C-terminal y en su extremo N-terminal un dominio regulador. Aunque no se conoce con detalle cómo se activa la MAPKKK se cree que, es a través de un cambio conformacional de la misma o debido al desplazamiento de proteínas que inhiben la activación de su dominio catalítico (Banuett, 1998). Seguidamente se produce la activación de la MAPKK por fosforilación en residuos serina o treonina que se encuentran localizados en el subdominio catalítico VIII de la misma. Finalmente la MAPK es fosforilada por la MAPKK en dos residuos treonina y tirosina específicos. Estos residuos se encuentran localizados en el dominio de activación TXY (donde X representa al aminoácido ácido glutámico, prolina o glicocola, dependiendo del tipo de MAPK) del subdominio VIII. Es necesaria la fosforilación de ambos residuos por parte de la MAPKK para la activación de la MAPK, por lo que la desfosforilación de uno de ellos basta para inactivarla.

Después de la activación mediante fosforilación de la MAPK, en algunos casos esta se transloca al núcleo celular donde activa a sus dianas como pueden ser factores de transcripción (FT) u otras moléculas que permitan la transcripción de genes diana para la elaboración de la respuesta que permita la adaptación a las nuevas condiciones.

Una vez que ha tenido lugar la transmisión de la señal y por tanto el desencadenamiento de la respuesta, es necesario que la ruta regrese a los niveles basales de activación, para ello existen mecanismos de retroalimentación entre los que se encuentran las fosfatasas específicas.

I. Adaptación a defectos en la pared celular y cambios morfogénéticos

La pared celular de *C. albicans* está sometida a continuas modificaciones para así poder adaptarse a los cambios que se producen en el ambiente, cambios fisiológicos (como la gemación, filamentación o crecimiento), así como daños en su estructura debido al

Introducción

tratamiento con antifúngicos (como caspofungina) o a compuestos químicos (como rojo Congo o blanco de calcoflúor). Por ello si la célula tiene defectos en la capacidad de reparación de estos daños, puede acabar viendo comprometida su integridad celular.

Para evitar la pérdida de la integridad celular *C. albicans* posee una ruta de transducción de señales que la permite revertir tal efecto y que es mediada por la MAP quinasa Mkc1 (homóloga de Slf2/Mpk1 en *S. cerevisiae*). Esta ruta es dependiente de la proteína quinasa C Pkc1 que es la encargada de transmitir la señal al módulo de las MAP quinasa. Pkc1 fosforila a la MAPKKK Bck1, la cual fosforila a la MAPKK Mkk2 y esta finalmente fosforila a la MAP quinasa Mkc1 (Figura 9.A) (Navarro-García *et al.*, 2005).

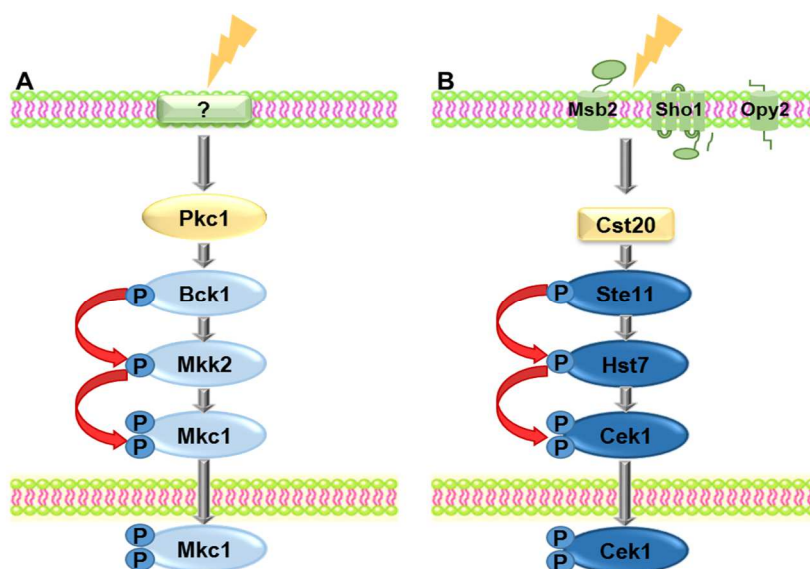


Figura 9. Rutas de transducción de señales mediadas por las MAP quinasa Mkc1 y Cek1 en *C. albicans*.

(A) Se muestran los elementos de la ruta de integridad celular mediada por Mkc1. Tras la pérdida de la integridad celular, se produce la fosforilación secuencial del módulo de MAP quinasa (Bck1, Mkk2 y Mkc1). Posteriormente, Mkc1 se transloca al núcleo donde activa o reprime genes que permiten la recuperación de la integridad celular. (B) Se representan los elementos de la ruta de biogénesis y reparación de la pared celular. En este caso, tras la detección de daños en la pared celular o en situaciones de crecimiento activo de la célula, se produce la activación de la cascada de señalización (Ste11, Hst7 y Cek1) y la posterior translocación al núcleo de Cek1 donde activará o reprime genes de respuesta a los cambios percibidos.

Mkc1 además de participar en el mantenimiento de la integridad celular, participa también en la respuesta a estrés oxidativo, siendo esta respuesta parcialmente dependiente de la ruta HOG (Navarro-García *et al.*, 2005; Arana *et al.*, 2005). Participa, además, en la transición morfológica, en la biogénesis de la pared celular (Navarro-García *et al.*, 1998), la formación de biopelículas (Kumamoto, 2005) y contribuye a la virulencia (Diez-Orejas *et al.*, 1997).

Además de la ruta anteriormente descrita, la célula puede responder a los daños en su pared celular a través de la ruta conocida como de crecimiento vegetativo o SVG (*Sterile Vegetative Growth*) mediada por la MAP quinasa Cek1. Se ha descrito que Msb2, Sho1, y Opy2 son los elementos que median la activación de Cek1 en respuesta a los daños ocasionados en la pared celular por compuestos como rojo Congo, caspofungina o zimoliasa entre otros (Herrero de Dios C. *et al.*, 2013; Román *et al.*, 2009b; Román *et al.*, 2005). La señal parece ser transmitida a la proteína quinasa, homóloga de Ste20, Cst20 y de ésta, al módulo de las MAP quinasas. El primer elemento de este módulo es la MAPKKK Ste11 que activa por fosforilación a la MAPKK Hst7, la cual a su vez fosforila a la MAPK Cek1 (Eisman *et al.*, 2006; Román *et al.*, 2005). En esta ruta actúa una fosfatasa denominada Cpp1 que se cree desfosforila a Cek1 (Csank *et al.*, 1997).

A parte de participar en la reparación de daños en la pared celular, la vía mediada por Cek1 también participa en la transición dimórfica e invasión. Como ya indicamos en el punto anterior, el crecimiento hifal es estimulado por distintos tipos de condiciones, y se ha demostrado la activación de Cek1 en respuesta a N-acetilglucosamina (Puri *et al.*, 2012). Se ha descrito que mutantes en elementos de la vía mediada por Cek1 como *sho1*, *msb2*, *cst20*, *hst7* o *cek1* muestran defectos en la formación de hifas y en su capacidad invasiva en medio sólido (Román *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 1994). Además, se ha comprobado que la ausencia de Cek1 confiere una capacidad de virulencia menor en el modelo de infección sistémica de ratón, no obstante, no es más susceptible a macrófagos y neutrófilos (Arana *et al.*, 2007; Csank *et al.*, 1998). Esta proteína está sometida a regulación por *quorum sensing* (mecanismo de control de la expresión génica dependiente de la densidad celular). Se activa en salida de fase estacionaria y dicha activación es bloqueada por farnesol (molécula de *quorum sensing* que regula la transición dimórfica) (Román *et al.*, 2009a).

II. Respuesta y Adaptación al estrés osmótico

El estrés osmótico se produce cuando las células se ven expuestas a altas concentraciones de sales o compuestos que aumentan la presión osmótica en el medio, tales como cloruro sódico, cloruro potásico o sorbitol. Este hecho provoca un desequilibrio entre las concentraciones del exterior y del interior de la célula, lo que trae consigo la pérdida rápida de agua (la membrana plasmática es más permeable al agua que a los solutos), una

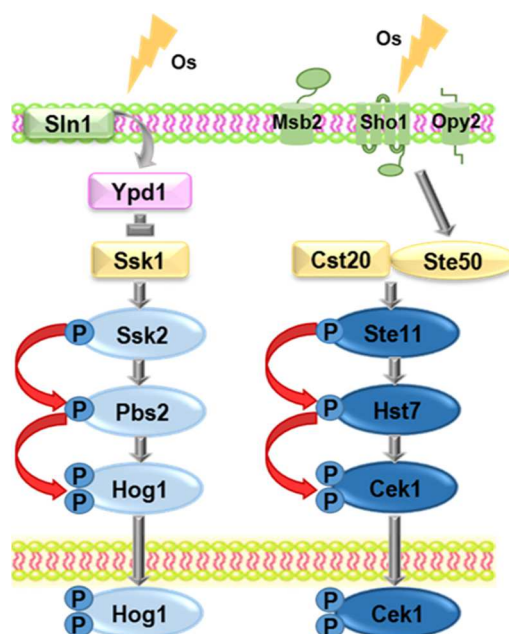
Introducción

reducción del tamaño y una pérdida de la turgencia viéndose finalmente comprometida la viabilidad de la célula.

Tanto en *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002; de Nadal *et al.*, 2002; Posas and Saito, 1997) como en *C. albicans* la respuesta y adaptación al estrés osmótico está mediada principalmente por la ruta de transducción de señales denominada ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*) (Enjalbert *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004; Alonso-Monge *et al.*, 2003; San José C. *et al.*, 1996).

Figura 10. Rutas implicadas en la respuesta a estrés osmótico en *C. albicans*.

Esquema representativo de las cascadas de transducción de señales en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. La rama Sln1-Ypd1-Ssk1 es la vía fundamental de activación de Hog1. Una vez que Hog1 es doblemente fosforilado se transloca al núcleo para desencadenar la respuesta a través de factores de transcripción y de elementos reguladores. Por otro lado, en respuesta a estrés osmótico también se produce la fosforilación de Cek1, incluso en ausencia de Msb2, Sho1 y Opy2. Os = estrés osmótico.



En *S. cerevisiae* la activación de esta ruta es mediada por dos ramas independientes. Por un lado, la rama mediada por la histidina-quinasa Sln1 se activa en respuesta a una mayor concentración de osmolitos en el medio. Por otro lado, la mediada por el osmosensor Sho1 que responde a pequeños incrementos en la osmolaridad externa (Maeda *et al.*, 1994). La rama Sln1 está formada por un complejo de señalización formado por Sln1, Ypd1 y Ssk1, actuando este último como activador de las proteínas Ssk2/Ssk22 (dos MAPKKKs que son parcialmente redundantes). La segunda rama implica a los osmosensores Sho1, Msb2, Hkr1 y Opy2, y requiere además de Cdc42 (GTPasa que interacciona con Msb2), Ste20 (proteína activadora quinasa) y que converge con Pbs2 (proteína que actúa como andamiaje o *scaffold*) y el complejo Ste11/Ste50 (de Nadal *et al.*, 2002; Posas *et al.*, 2000).

Esta ruta en *C. albicans* es dependiente de la MAP quinasa Hog1, la cual es fosforilada por la MAPKK Pbs2 (Arana *et al.*, 2005) que a su vez es fosforilada por Ssk2 la MAPKKK de la ruta (Cheetham *et al.*, 2007) (Figura 10). La MAP quinasa Hog1, tras fosforilarse, se transloca al núcleo donde a través de factores de transcripción media la respuesta transcripcional y la consiguiente adaptación. Uno de estos factores de transcripción es Sko1, el cual está implicado en la transcripción de genes involucrados tanto en la producción como la acumulación de glicerol, lo que permite recuperar la turgencia a la célula (Marotta *et al.*, 2013; Rauceo *et al.*, 2008).

Cek1 (cuyo homólogo en *S. cerevisiae* es Kss1) está también implicada en la respuesta frente a estrés osmótico, ya que es capaz de fosforilarse en presencia de agentes osmoestresantes (Herrero de Dios *et al.*, 2014). Esta capacidad de activación de Cek1 se ha descrito como independiente de los sensores de la ruta mediada por Cek1 (Msb2, Sho1 y Opy2), ya que en los mutantes *ssk1 msb2 sho1* e incluso *ssk1 msb2 sho1 opy2*, Cek1 se fosforila en presencia de distintas concentraciones de cloruro sódico. Estos mutantes, además, son capaces de acumular glicerol para la recuperación de la turgencia celular (Herrero de Dios *et al.*, 2014; Herrero de *et al.*, 2013; Román *et al.*, 2009b; Román *et al.*, 2005).

3. Respuesta de *Candida albicans* frente a estrés oxidativo

A. Especies reactivas y sus efectos

Los organismos están en constante exposición a especies reactivas del oxígeno (ROS) (*Reactive Oxygen Species*), ya que éstas son producidas por el propio metabolismo aeróbico de las células tales como la respiración o procesos metabólicos como la β -oxidación de ácidos grasos. Además, el carácter comensal de *C. albicans* supone que, debe también hacer frente a las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que generan las células del sistema inmunitario, como macrófagos y neutrófilos, para la destrucción de los patógenos localizados en las superficies de las mucosas. En condiciones de laboratorio, las ROS son producidas por la exposición a compuestos generadores de radicales (menadiona, diamida, peróxidos) o radiaciones ionizantes (Halliwell, 2006).

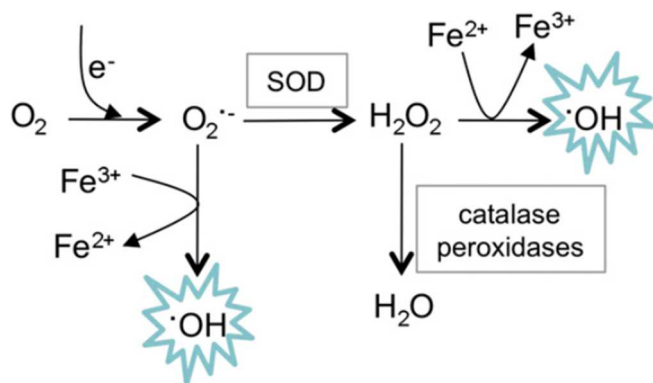


Figura 11. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Esquema de la reducción secuencial del oxígeno molecular (O_2) para la generación de las diferentes especies reactivas de oxígeno. La adición de un electrón al oxígeno molecular genera el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que por acción de la superóxido dismutasa (SOD) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o bien por reducirse hasta el radical hidroxilo ($\bullet OH$) por la reacción de Haber-Weiss. El peróxido de hidrógeno puede ser detoxificado por la acción enzimática de catalasas y peroxidases o bien reducirse parcialmente a radical hidroxilo ($\bullet OH$) por la reacción de Fenton (Morano *et al.*, 2012).

Las especies reactivas de oxígeno son una serie de moléculas generadas a partir del oxígeno molecular (O_2), mientras que los radicales libres son especies que poseen uno o dos electrones desapareados (Herrero *et al.*, 2008). El oxígeno molecular es un bi-radical libre que posee dos electrones no apareados en la capa exterior, por lo que puede aceptar hasta un par de electrones. Cuando uno de estos electrones se excita cambia su giro formándose la especie oxígeno singlete (1O_2), que sin ser un radical libre es un poderoso oxidante. Sin embargo, cuando la molécula de oxígeno acepta un electrón se reduce generando el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), este es generado fundamentalmente a nivel de la cadena transportadora de electrones y es el precursor de la mayoría de las ROS. A partir del anión superóxido y por dismutación (espontánea o catalizada por la superóxido dismutasa (SOD)) se genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno es detoxificado a agua y oxígeno por acción de las enzimas catalasa y peroxidasa. Por último el radical hidroxilo ($\bullet OH$) se puede generar de dos formas distintas: el peróxido de hidrógeno es reducido parcialmente mediante la reacción de Fenton en presencia de iones metálicos como el hierro o el cobre o por la reacción de Haber-Weiss que cataliza la cesión de un electrón al hierro (Fe^{3+}) por parte del anión superóxido (Figura 11).

El efecto tóxico de las ROS se debe a su interacción con las moléculas de las células como son los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La especie más reactiva y por tanto más dañina es el radical hidroxilo ($\bullet OH$) seguida del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y finalmente del peróxido de hidrógeno. Los daños que producen estos radicales en la célula

son muy variados. La peroxidación de los lípidos genera una disminución tanto de la fluidez como de la integridad de la membrana celular. El anión superóxido oxida enzimas que contienen centros de hierro-sulfuro (Fe/S), provocando la pérdida de la funcionalidad de las mismas (Flint *et al.*, 1993). El peróxido de hidrógeno por su parte puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos (Stadtman and Levine, 2003). Las ROS pueden, además, producir roturas en la doble hebra de ADN y pérdida de bases nitrogenadas.

B. Señalización de la presencia de especies reactivas

En *C. albicans*, uno de los mecanismos que permite la adaptación frente al daño oxidativo, bien sea intra o extracelular, es la activación de la ruta HOG (Arana *et al.*, 2005; Alonso-Monge *et al.*, 2003). La respuesta es mediada principalmente por la proteína reguladora Ssk1, ya que su delección implica mayor susceptibilidad frente al estrés oxidativo y el bloqueo de la fosforilación de Hog1 (Chauhan *et al.*, 2003). No se conoce por el momento cuál de las histidinas quinasas conocidas en *C. albicans* (Chk1, Sln1 y Nik1) es la responsable de detectar y regular la fosforilación de Ssk1 en respuesta al estrés oxidativo. Esto es debido a que tanto la delección única de *CHK1*, como de ésta con cualquiera de las otras dos histidinas quinasas, no suprime la activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo (Menon *et al.*, 2006; Román *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004). Por otro lado, la proteína de membrana Sho1 parece tener también un papel poco relevante en la señalización del estrés oxidativo; aunque los mutantes *sho1* muestran una ligera sensibilidad frente a agentes oxidantes no son deficientes en la activación de Hog1 en respuesta a este tipo de agentes (Román *et al.*, 2005).

Tras la activación de Ssk1, ésta fosforila a Ssk2 que actúa como la única MAPKKK de la ruta, al contrario de lo que sucede en *S. cerevisiae* (Cheetham *et al.*, 2007). Tras su fosforilación interacciona con la MAPKK Pbs2 fosforilándola, la cual a su vez media la fosforilación de Hog1 (Arana *et al.*, 2005), permitiendo la translocación de esta al núcleo donde regula la transcripción de genes que permiten la respuesta y la adaptación a las nuevas condiciones oxidantes.

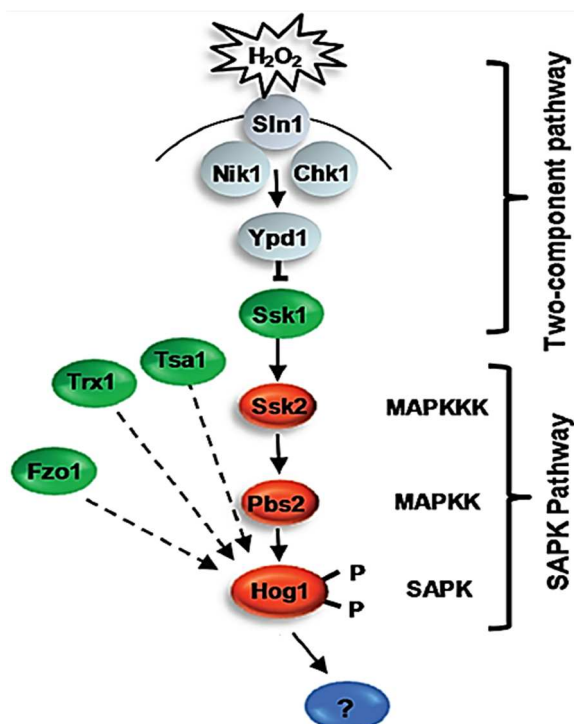


Figura 12. Ruta de activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo en *C. albicans*.

Esquema que muestra la ruta de transducción de señales en respuesta a peróxido de hidrógeno. Tras la detección del peróxido de hidrógeno la señal es transmitida a través del módulo de las MAPK (SAPK). Una vez que Hog1 es fosforilada se transloca al núcleo donde regula genes de respuesta al estrés oxidativo. Las proteínas requeridas para la activación de Hog1 en respuesta a peróxido de hidrógeno se representan en verde. (Dantas *et al.*, 2015).

En la activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo intervienen tanto el farnesol como proteínas antioxidantes y mitocondriales. La molécula isoprenoide de *quorum sensing* farnesol provoca daño oxidativo, debido a que media la acumulación intracelular de ROS, lo que conlleva a la fosforilación de Hog1 (Deveau *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2004). La proteína antioxidante Tsa1 (peroxidasa tiorredoxina) y la tiorredoxina Trx1 (que regula el estado redox de Tsa1) son necesarias para la inducción de Hog1 en presencia de peróxido de hidrógeno. Tsa1, según su estado redox puede encontrarse en forma dimérica (forma oxidada) o monomérica (forma reducida). En su forma dimérica actúa como inhibidora de la activación de Hog1, mientras que cuando se encuentra en forma monomérica lo hace como activadora de la misma (da Silva *et al.*, 2010). También se ha descrito la implicación de Hog1 en el metabolismo respiratorio, ya que su delección implica una mayor susceptibilidad frente a inhibidores de la cadena respiratoria, genera una mayor tasa de respiración basal y un incremento de ROS intracelular (Alonso-Monge *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito que la delección de *FZO1* (gen que codifica una proteína implicada en la biogénesis de la mitocondria), se traduce en defectos en la activación de Hog1 en respuesta a peróxido de hidrógeno (Thomas *et al.*, 2013). Por tanto, la mitocondria juega un papel importante en la regulación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo.

Otras rutas que contribuyen a la señalización del estrés oxidativo son las rutas de integridad celular (PKC) y la ruta de cAMP/PKA. La ruta de integridad celular es mediada por la MAP quinasa Mkc1, la cual es activada bajo condiciones tanto de estrés oxidativo (menadiona, H_2O_2) como estrés nitrosativo (S-nitrosoglutation), aunque su delección no implica susceptibilidad frente a estos compuestos. Además, frente a algunos estímulos, la fosforilación de Mkc1 necesita de la presencia de Hog1 como en el caso del peróxido de hidrógeno donde ambas MAP quinasas son activadas, lo que sugiere la existencia de un papel regulador de Hog1 sobre la ruta mediada por Mkc1 en estas condiciones (Navarro-García *et al.*, 2005; Arana *et al.*, 2005).

La ruta AMPc/PKA parece tener un efecto negativo en la respuesta a estrés oxidativo. Diversos estudios han demostrado que la delección de elementos de esta ruta confiere una mayor susceptibilidad frente al peróxido de hidrógeno, como es el caso de los mutantes en las isoformas catalíticas de PKA *tpk1*, *tpk2* y en la fosfodiesterasa *pde2* (Giacometti *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2007). Deveau y colaboradores han demostrado que la interrupción de la cascada de Ras-AMPc provoca un incremento en los niveles de fosforilación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo, aunque los elementos de enlace de ambas rutas aún no se han hallado. Estos autores han descrito que el farnesol induce resistencia frente a H_2O_2 mediante la inhibición de la ruta Ras-AMPc-PKA (Deveau *et al.*, 2010).

C. Respuesta y adaptación al estrés oxidativo

C. albicans, al igual que el resto de organismos, es capaz de responder tanto a las ROS como a las consecuencias que provocan en la célula. Para llevar a término esta respuesta debe expresar aquellos genes que codifiquen para los mecanismos de defensa (enzimas antioxidantes), detoxificación y reparación de los daños de la célula.

I. Factores de transcripción implicados en respuesta a estrés oxidativo

Los factores de transcripción son proteínas de localización nuclear que se unen a secuencias específicas de ADN y modulan la expresión de los genes. Estructuralmente, el factor de transcripción posee varios dominios: un dominio de reconocimiento y unión a secuencias específicas que se localizan en *cis* de las regiones del promotor (dedos de zinc, hélice-giro-hélice, cremallera de leucina y hélice-bucle-hélice), un dominio de activación que

media la unión a la maquinaria de transcripción regulando la transcripción de los genes diana (induciendo o reprimiendo la actividad de la RNA polimerasa II) y dominios de interacción con otras proteínas.

Los factores de transcripción pueden actuar como activadores o represores de la transcripción de los genes que regulan. Aquellos que actúan como activadores pueden ejercer su función de distintas formas. Por una parte, en la formación del complejo de iniciación de la transcripción mediante el reclutamiento y unión de los factores de transcripción generales y de la RNA polimerasa II al promotor, induciendo un cambio conformacional o modificación post-traducciona (fosforilación, proteólisis) que estimule la actividad enzimática de la maquinaria de transcripción. Por otra parte, mediante la interacción con los complejos de remodelación de la cromatina. Sin embargo, aquellos que son represores, actúan bloqueando la maquinaria general de la transcripción.

En la respuesta y adaptación de *C. albicans* frente a estrés oxidativo se han identificado hasta ahora dos factores de transcripción: Cap1 y Skn7. A continuación se detallan las características de cada uno de estos factores de transcripción.

a) Cap1

Cap1 se ha descrito como un regulador clave en la respuesta de *C. albicans* frente al estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2000; Alarco and Raymond, 1999). Cap1 posee un dominio de unión a ADN de tipo cremallera de leucina (bZip). Pertenece a la familia AP-1 y es ortólogo de los factores de transcripción Yap1 y Pap1 de *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* respectivamente. La delección de *CAP1* provoca sensibilidad frente a compuestos oxidantes (diamida, H₂O₂) y diversos fármacos (fluconazol); así como una menor capacidad de supervivencia frente a células del sistema inmunitario (macrófagos y neutrófilos) y una menor capacidad de virulencia tanto en un modelo de infección en nematodo *Caenorhabditis elegans* como en un modelo de infección sistémica en ratón (Jain *et al.*, 2013).

La presencia de H₂O₂ promueve la oxidación y por tanto la activación de Cap1 a través de las proteínas Gpx3 y Ybp1. En el citoplasma Cap1 está formando complejo con la proteína Ybp1, lo que evita su degradación y que pueda ser oxidado por Gpx3 (glutathion peroxidasa). Una vez que es oxidado se transloca y se acumula en el núcleo donde tras

fosforilarse induce la transcripción de genes necesarios para la supervivencia celular (Patterson *et al.*, 2013). Regula entre otros la transcripción de genes antioxidantes como *CAT1*, *SOD1*, *GLR1* y *TRX1* que codifican una catalasa, una superóxido dismutasa, una glutatión reductasa y una tioredoxina respectivamente. Participa también en el reclutamiento del coactivador Ada2 (componente del complejo activador transcripcional SAGA/ADA) para la activación de ciertos genes como *MDR1* (bomba de flujo que confiere resistencia frente a compuestos tóxicos para la célula) en presencia de H₂O₂ (Ramírez-Zavala *et al.*, 2014; Znaidi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2000).

A pesar de que algunos de los genes que regula Cap1 también los regula Hog1, ambas proteínas parecen actuar de manera independiente. Estudios fenotípicos han demostrado que la delección de *HOG1* no influye en la localización celular de Cap1, al igual que la delección de *CAP1* no provoca alteración alguna en el patrón de fosforilación de Hog1 (Enjalbert *et al.*, 2006; Alonso-Monge *et al.*, 2003). Se ha descrito además que Cap1 está implicado en la regulación de genes de respuesta a bajas y altas concentraciones de peróxido de hidrógeno mientras que Hog1 solo lo es para concentraciones altas (Enjalbert *et al.*, 2006).

b) Skn7

La proteína reguladora Skn7, como Ssk1 forma parte de un sistema de señalización de dos componentes, siendo capaz de actuar como factor de transcripción en respuesta a estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2004). En *C. albicans*, Skn7 se encuentra localizada en el núcleo donde parece que podría ser fosforilado por Ypd1, al contrario de lo que sucede con Ssk1, cuya localización es citoplasmática donde es fosforilado por Ypd1 (Mavrianos *et al.*, 2014; Calera *et al.*, 2000a). *SKN7* codifica una proteína homóloga de la proteína reguladora Skn7 de *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae*, actúa como factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés oxidativo, choque térmico, control del ciclo celular y metabolismo de la pared celular y crecimiento invasivo. En *C. albicans*, Skn7 está implicada en la respuesta a estrés oxidativo, ya que la delección de *SKN7* genera células con una mayor sensibilidad a peróxido de hidrógeno e hidroperóxido de terbutilo, pero no a menadiona ni a otros agentes oxidantes, así como con una menor virulencia (Homann *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2004). A pesar de estar implicado en la respuesta a estrés oxidativo y al igual que el factor de transcripción Cap1, su fosforilación y su respuesta es independiente de Hog1 y de la ruta mediada por ésta (Singh *et al.*, 2004).

II. Mecanismos de detoxificación de ROS

Los organismos han desarrollado mecanismos de defensas frente a las especies reactivas de oxígeno, lo que les permite eliminarlas. La célula tiene mecanismos tanto para la detoxificación de estas ROS, con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, como para la reparación de los daños que éstas producen en las proteínas.

a) Enzimas encargadas de eliminar o mantener bajos los niveles de ROS

- **Catalasas.** Se trata de enzimas que catalizan la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua (H_2O) y oxígeno molecular. Son enzimas homotetraméricas, en las que cada monómero contiene en su centro catalítico un grupo Fe (III). Se caracterizan por una baja afinidad por el sustrato pero con una eficiencia catalítica muy elevada, por lo que son muy eficaces en ambientes en los que la concentración de H_2O_2 es muy elevada (peroxisomas). En el genoma de *C. albicans* el gen *CAT1*, codifica la catalasa citoplasmática (Wysong *et al.*, 1998). La expresión de *CAT1* se ve inducida en respuesta tanto a condiciones de estrés oxidativo y estrés osmótico en ensayos *in vitro* como por la fagocitosis por parte de neutrófilos (aunque no macrófagos) en un modelo *in vivo* (Enjalbert *et al.*, 2007; Enjalbert *et al.*, 2003). Diversos estudios han determinado que los mutantes *cat1* muestran una mayor susceptibilidad frente a peróxido de hidrógeno, altas temperaturas, detergentes (SDS y Triton X-100 y NP-40) y neutrófilos así como, una menor capacidad de permanencia en órganos (hígado, riñón y bazo) y por tanto menor capacidad de virulencia en un modelo de infección sistémica de ratón (Nakagawa *et al.*, 2003; Wysong *et al.*, 1998).

- **Superóxido dismutasas (SOD).** Son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido hasta peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular a través de reacciones de reducción y oxidación del metal de transición en el centro activo. Las isoformas se clasifican según el cofactor metálico que posean (cobre y zinc (CuZnSOD), níquel (NiSOD), hierro (FeSOD) y manganeso (MnSOD). Al igual que en el resto de eucariotas, *C. albicans* expresa superóxido dismutasas tanto citoplasmáticas (CuZnSOD) como mitocondriales (MnSOD), las cuales son codificadas por seis genes (*SOD1-SOD6*). Éstas, se pueden clasificar en función del cofactor del que dependan (Sod1, Sod4, Sod5 y Sod6 son dependientes de cobre y zinc, mientras que Sod2 y Sod3 son dependientes de manganeso) o bien por la localización celular de las mismas (son citoplasmáticas Sod1 y

Sod3, Sod2 se localiza en la mitocondria y Sod4-Sod6 son proteínas de superficie celular ancladas a GPI (Frohner *et al.*, 2009)). Se ha descrito que Sod1 protege a las células frente a los radicales superóxido producidos por los macrófagos y que es importante para la virulencia en modelo de ratón (Hwang *et al.*, 2002), mientras que Sod2 no tiene efecto en virulencia pero protege a las células de los aniones superóxido formados intracelularmente (Hwang *et al.*, 2003). Martchenko y colaboradores describieron que la expresión de SOD5 se ve inducida cuando se produce la transición levadura-hifa, y que es responsable de la detoxificación de radicales superóxido generados durante la fase logarítmica y el crecimiento hifal (Martchenko *et al.*, 2004). Por lo tanto, las superóxido dismutasas que mayor repercusión tienen para la virulencia son Sod1 y Sod5 como se ha podido comprobar en modelos de infección sistémica de ratón.

- **Peroxidasas.** Son enzimas que reducen peróxidos al alcohol correspondiente usando como donador de electrones los grupos sulfhidrilo (tiol) del residuo de cisteína del centro activo. Se distinguen dos clases de peroxidasas: las glutatión peroxidasas (GPXs) y las peroxirredoxinas (TRX peroxidasas).

Las GPXs emplean el poder reductor del L-γ-glutamyl-L-cisteinilglicina (GSH) para reducir el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos a los correspondientes alcoholes. En *C. albicans*, *GPX1* codifica la glutatión peroxidasa Gpx1 implicada en la resistencia a azoles (Rogers and Barker, 2003; Rogers and Barker, 2002) y cuya expresión es inducida *in vitro* en respuesta a condiciones de estrés oxidativo moderado-alto (e incluso se ve más inducida en un mutante *hog1*) y tras la internalización de la célula por parte del macrófago (Enjalbert *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2004).

Las peroxirredoxinas, son capaces de catalizar la transferencia de electrones de los grupos sulfhidrilos a los peróxidos y peroxinitritos para así reducirlos. Durante la catálisis el residuo de cisteína localizado en el sitio activo es oxidado a ácido sulfénico mientras que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o el peroxinitrito es reducido a agua o nitrito. Estas enzimas se dividen en función del número de residuos de cisteína implicados en la reacción: 2-Cys PRXs típicas (son homodímeros que poseen cisteínas tanto en C-terminal como en N-terminal conservadas), 2-Cys PRXs atípicas (solo poseen el residuo de cisteína de N-terminal pero necesitan de otra cisteína adicional la cual no está conservada para la reacción catalítica), 1-Cys PRX (son monómeros, las cuales solo conservan la cisteína

situada en la región N-terminal). En *C. albicans*, se han identificado Tsa1 y Prx1 como peroxirredoxinas. Tsa1 es una proteína que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células levaduriformes y en la pared celular de la hifa dependiente de los factores de transcripción Efg1 y Tup1. Confiere resistencia frente al estrés oxidativo aunque su delección no muestra variación en la capacidad de virulencia de *C. albicans*. Está también implicada en el correcto ensamblaje de la pared celular de las hifas, ya que los mutantes *tsa1* muestran mayor susceptibilidad a compuestos que dañan la pared celular y defectos morfológicos (Urban *et al.*, 2005). Prx1, por su parte, es una peroxirredoxina implicada en la reducción de los peróxidos orgánicos de la célula como demuestra tanto la susceptibilidad de los mutantes *prx1* como la inducción de la expresión de *PRX1* en presencia de estos compuestos. Además, su localización celular varía en función del estado morfológico de la célula, encontrándose en el citoplasma en células levaduriformes mientras que es translocada al núcleo en las hifas (Srinivasa *et al.*, 2012).

b) Mecanismos de reparación

Los aminoácidos que poseen azufre en su cadena lateral (cisteína y metionina) son los objetivos de las modificaciones durante el estrés oxidativo. Las células poseen sistemas enzimáticos para reparar los daños ocasionados por la oxidación en los grupos sulfhidrilo de las cisteínas y por la oxidación de las metioninas. Estos mecanismos son llevados a cabo por las glutarredoxinas y tioredoxinas tanto en el citoplasma como en el núcleo o la mitocondria.

- **Sistema Glutarredoxina.** Este sistema está formado por las glutarredoxinas, NADPH, glutathione (GSH) y la glutathione reductasa. En este sistema los electrones se transfieren desde el NADPH a las glutarredoxinas a través del glutathione (donador de hidrógenos), mientras que la glutathione reductasa se encarga de revertir el estado de oxidación del glutathione, a través de los electrones del NADPH. Las glutarredoxinas son oxidoreductasas con un sitio activo que contiene dos cisteínas unidas por un puente disulfuro. La estructura de este sitio activo permite clasificar a estas enzimas en dos. Por un lado las ditiólicas, las cuales presentan en su centro activo la secuencia Cys-Pro-Tyr-Cys, estas se encargan de reducir los puentes disulfuro formados entre los grupos tiol de las proteínas. Por otro lado, estarían las monitiólicas, cuya secuencia es Cys-Gly-Phe-Ser y que se encargan de reducir los puentes disulfuro creados entre el glutathione y los grupos tiol de las proteínas. Solo se ha identificado y descrito Grx2 (llamado anteriormente Ttr1) como

glutarredoxina en *C. albicans*. La delección de *GRX2* implica sensibilidad frente a menadiona y neutrófilos, así como una mayor atenuación de la virulencia y una menor presencia en órganos en un modelo de infección sistémica en ratón (Chaves *et al.*, 2007).

- **Sistema tioredoxina.** Formado por la tioredoxina (Trx) y la tioredoxina reductasa (TrxR) e implicado en la reducción de los puentes disulfuro de las proteínas. La tioredoxina es una enzima dimérica cuyo centro activo posee dos cisteínas cuya secuencia está conservada (Cys-Gly-Pro-Cys). Posee un dominio cuya estructura tridimensional se caracteriza por estar formada por 4-5 láminas β rodeadas por 3-4 α -hélices (Martin, 1995). La tioredoxina se oxida al reducir los puentes disulfuro de las proteínas y para recuperar su estado de reducción la tioredoxina reductasa emplea el NADPH como donador de electrones. Se ha descrito en *C. albicans* que la proteína Trx1 es una tioredoxina cuya función principal es la de antioxidante (reduciendo sustratos oxidados) aunque también actúa como represora de la activación del factor de transcripción Cap1 y del crecimiento celular polarizado. Además, la delección de *TRX1* bloquea la fosforilación de Hog1 en respuesta de peróxido de hidrógeno y confiere a las células una menor capacidad de virulencia en el modelo de infección sistémica de ratón (da Silva *et al.*, 2010).

PLANTEAMIENTO

Las rutas de transducción de señal son uno de los mecanismos principales a través de los cuales la célula es capaz de percibir señales extracelulares, desencadenando así una respuesta adecuada para adaptarse a las condiciones que iniciaron la señal. Estas rutas implican la activación o inactivación de distintas proteínas de modo secuencial que conduce a la activación o represión de factores de transcripción que regulan la respuesta celular.

Nuestro grupo de investigación trabaja desde hace años en las rutas de transducción de señales mediadas por quinasas tipo MAP en la levadura patógena oportunista *Candida albicans*. Estas rutas de señalización tienen funciones relevantes para la fisiología de *C. albicans* ya que median la respuesta a diferentes tipos de estrés, median la respuesta a *quorum sensing* y, responden a cambios en la temperatura ambiental entre otros. Aunque estas rutas están caracterizadas en mayor o menor profundidad se conoce poco de los factores de transcripción que estas rutas regulan. El trabajo planteado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en caracterizar factores de transcripción que medien la respuesta de estas rutas en *C. albicans*, centrándonos principalmente en el estrés oxidativo como eje del trabajo.

El factor de transcripción Sko1 fue identificado en *C. albicans* por homología a través de su similitud con su ortólogo en *S. cerevisiae*. En este trabajo hemos profundizado en su estudio, cuantificando su expresión en distintas condiciones así como estudiado su relevancia en un modelo de comensalismo en ratón. Además, hemos llevado a cabo un rastreo para identificar otros factores de transcripción que pudiesen también estar implicados en la respuesta o adaptación a estrés oxidativo.

RESULTADOS

1. Caracterización del factor de transcripción Sko1 en *C. albicans*

En *S. cerevisiae* Sko1 es un factor de transcripción regulado por la MAP quinasa Hog1, que actúa como activador y represor de la transcripción de genes implicados en respuesta a estrés osmótico (Proft *et al.*, 2001; Proft and Serrano, 1999). En *C. albicans* el gen *SKO1* codifica Sko1 (proteína homóloga de Sko1 en *S. cerevisiae*). Se trata también de un factor de transcripción con un dominio de unión a DNA de tipo cremallera de leucina (bZIP) localizado en el extremo C-terminal de la proteína. En CaSko1 al igual que en ScSko1 se encuentran conservados los tres sitios de fosforilación de la MAP quinasa Hog1, localizados en los aminoácidos 83, 88 y 101, mientras que de los tres sitios de fosforilación por la proteína quinasa A (PKA), sólo se conserva uno en *C. albicans* (aminoácido 404).

A. Papel de Sko1 en la respuesta a diferentes tipos de estrés

La ruta HOG está implicada en la respuesta a estrés, tanto osmótico como oxidativo. Nuestro grupo ha puesto de manifiesto que la delección de *HOG1*, otorga a las células mayor sensibilidad frente a compuestos osmoestresantes y oxidantes (Alonso-Monge *et al.*, 2003; San José C. *et al.*, 1996). El factor de transcripción Sko1 en *S. cerevisiae* es fosforilado por Hog1 en respuesta a estrés osmótico permitiendo así la activación de genes de respuesta a este tipo de estrés (Proft *et al.*, 2001). Nosotros nos planteamos estudiar la relevancia de Sko1 en respuesta a estrés oxidativo y la posible relación con la ruta HOG. En un trabajo anterior (V. Urrialde, Diploma de Estudios Avanzados) se llevó a cabo la delección del gen *SKO1* en distintos fondos genéticos. En esta Tesis doctoral nos planteamos continuar estos estudios.

I. Estudio de Sko1 en presencia de estrés osmótico

Para establecer el papel de Sko1 en respuesta a estrés osmótico llevamos a cabo un ensayo de sensibilidad en medio sólido mediante la técnica de siembra en gota. Se sembraron diluciones seriadas en placas con medio sólido de YPD suplementadas con 1 M de cloruro sódico o 1 M de Sorbitol, partiendo para ello de cultivos en fase exponencial.

Como se aprecia en la Figura 13, el mutante *sko1* muestra una ligera sensibilidad frente a los compuestos ensayados. Por su parte, el doble mutante *hog1 sko1* presenta una

Resultados

mayor sensibilidad a éstos que el mutante sencillo *sko1*. Curiosamente, esta sensibilidad es menor que la presentada por el mutante sencillo *hog1*. También podemos observar como los fenotipos se revierten cuando reintegramos *SKO1-GFP* en los mutantes *sko1* y *hog1 sko1*. Por lo tanto, el doble mutante presenta un fenotipo intermedio entre la cepa silvestre y el mutante *hog1*. La reintegración de la fusión *SKO1-GFP* bajo el control del promotor *ACT1* (cepas *sko1^{reint}*) es funcional y permite concluir que la delección de *SKO1* en un mutante *hog1* mejora el crecimiento en medios hiperosmóticos.

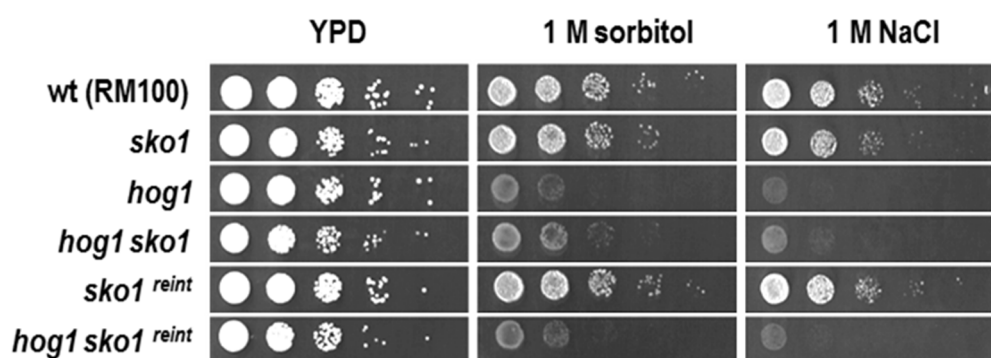


Figura 13. Fenotipo de las cepas delecionadas en *SKO1* en presencia de estrés osmótico.

Diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial fueron sembradas en medio sólido YPD suplementadas o no con 1 M de Sorbitol o 1 M de NaCl. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y transcurrido ese tiempo se escanearon.

Para analizar la regulación transcripcional de *Sko1* en respuesta a estrés osmótico y su dependencia de la ruta mediada por *Hog1*, integramos la construcción que contiene la región promotora del gen *SKO1* fusionada a una versión adaptada para su expresión en *C. albicans* (Tesis de D. Prieto) del gen de la luciferasa procedente del escarabajo elatérico del Caribe (*Pyrophorus plagiophthalmus*) que denominamos *CbLUC* (Hida *et al.*, 2009), tanto en una cepa silvestre como en el mutante *hog1*. Incluimos igualmente como cepas receptoras los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* en este estudio (véase más detallado en Materiales y Métodos). Para estudiar la expresión de *SKO1* en respuesta a estrés osmótico tomamos muestras a distintos tiempos durante 60 minutos tras la adición de cloruro sódico a 1 M de concentración final.

Como podemos observar en la Figura 14, la expresión de *SKO1* en una cepa silvestre disminuye en los primeros 15 minutos tras la adición del agente osmoestresante para luego mantenerse estable en el tiempo. En los 60 minutos analizados la expresión de *SKO1* no

recupera los niveles basales. El mismo descenso de la expresión de *SKO1* puede observarse tanto en un mutante *hog1* como en el doble mutante, aunque en éstos sí se recuperan los niveles basales a los 60 minutos. Por el contrario, en un mutante *sko1* los niveles de expresión se mantienen estables en el tiempo observándose una ligera inducción en la expresión a los 15 minutos que se mantiene en el tiempo. Por lo tanto, un incremento en la osmolaridad externa induce un descenso de la expresión de *SKO1*, y ello es dependiente de *Sko1*.

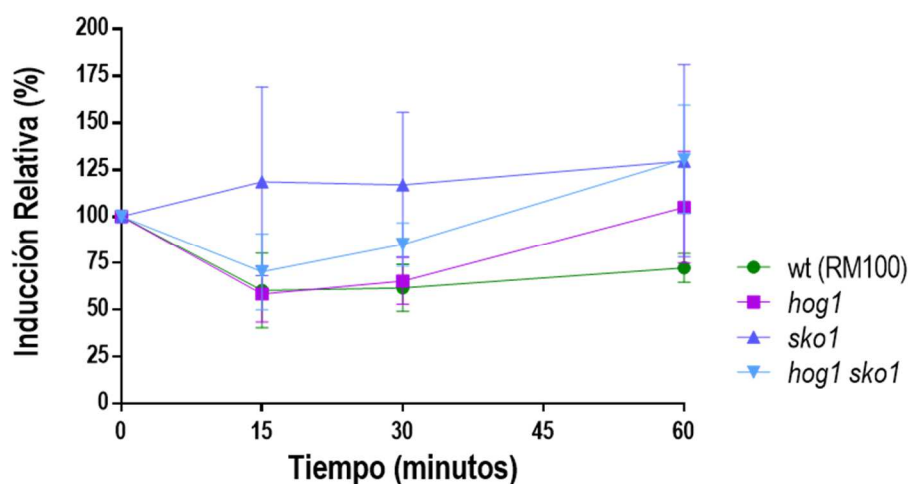


Figura 14. Cinética de expresión de *SKO1^{pr}-CbLUC* en respuesta a estrés osmótico.

Expresión de *SKO1^{pr}-CbLUC* en respuesta a 1 M de NaCl en una cepa silvestre y los mutantes *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1*. Los valores están normalizados frente al tiempo 0 o basal de cada cepa, siendo este valor de 100. Se representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

II. Papel de *Sko1* en respuesta a estrés oxidativo

a) *Sko1* juega un papel importante en la respuesta frente a estrés oxidativo

Para establecer el papel de *Sko1* en respuesta a estrés oxidativo llevamos a cabo tres ensayos diferentes de forma paralela: diluciones seriadas, viabilidad celular en medio líquido e inhibición del crecimiento por difusión en medio sólido.

Se sembraron diluciones seriadas en placas de YPD suplementadas con 5 mM de peróxido de hidrógeno y 300 μ M de menadiona como agentes oxidantes, partiendo para ello de cultivos en fase exponencial. El mutante *sko1* muestra una ligera sensibilidad a estos compuestos mientras que tanto el mutante *hog1* como el doble mutante *hog1 sko1* muestran

Resultados

una sensibilidad mayor. En presencia de menadiona el doble mutante es ligeramente más sensible incluso que el mutante *hog1* (Figura 15) aunque este efecto no es observable en presencia de peróxido de hidrógeno.

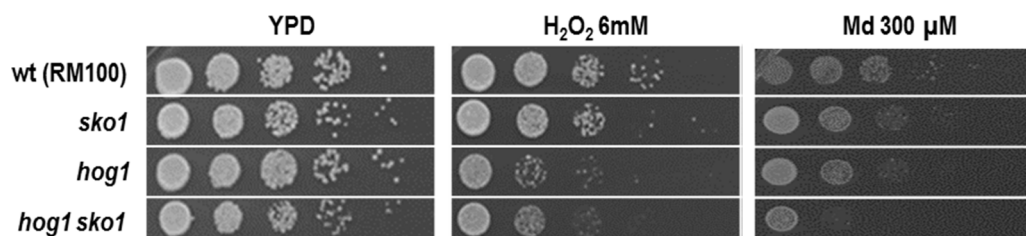


Figura 15. Sensibilidad a agentes oxidantes de las cepas delecionadas en SKO1.

Diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial fueron sembradas en placas de YPD suplementadas con 6 mM de H₂O₂ y 300 µM de menadiona. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y transcurrido ese tiempo se escanearon.

A continuación, se realizaron ensayos de caída de viabilidad, en los que se analizó la viabilidad celular en presencia de 50 mM de peróxido de hidrógeno o 20 mM de menadiona tomando muestras periódicas durante 60 minutos que se sembraron en placas de medio rico. En presencia de 50 mM de H₂O₂, el mutante *sko1* es ligeramente más sensible que la cepa silvestre, y al igual que lo observado en la sensibilidad en medio sólido, el doble mutante *hog1 sko1* presenta una sensibilidad intermedia entre el mutante *hog1* y el mutante *sko1* (Figura 16 A). Así, los mutantes *sko1* muestran dificultad para crecer tras 15 minutos de tratamiento con peróxido de hidrógeno, mientras que la cepa silvestre sigue creciendo tras 30 minutos de tratamiento. El mutante *hog1* muestra defectos en el crecimiento a partir de los 6 minutos de tratamiento y el doble mutante a los 10 minutos. En presencia de 20 mM de menadiona se observaron también diferencias de crecimiento entre las distintas cepas ensayadas. El mutante *sko1* presentó dificultad en el crecimiento tras 15 minutos de tratamiento, mientras que los mutantes *hog1* y *hog1 sko1* fueron incapaces de continuar creciendo tras los primeros 5 minutos de tratamiento (Figura 16.B).

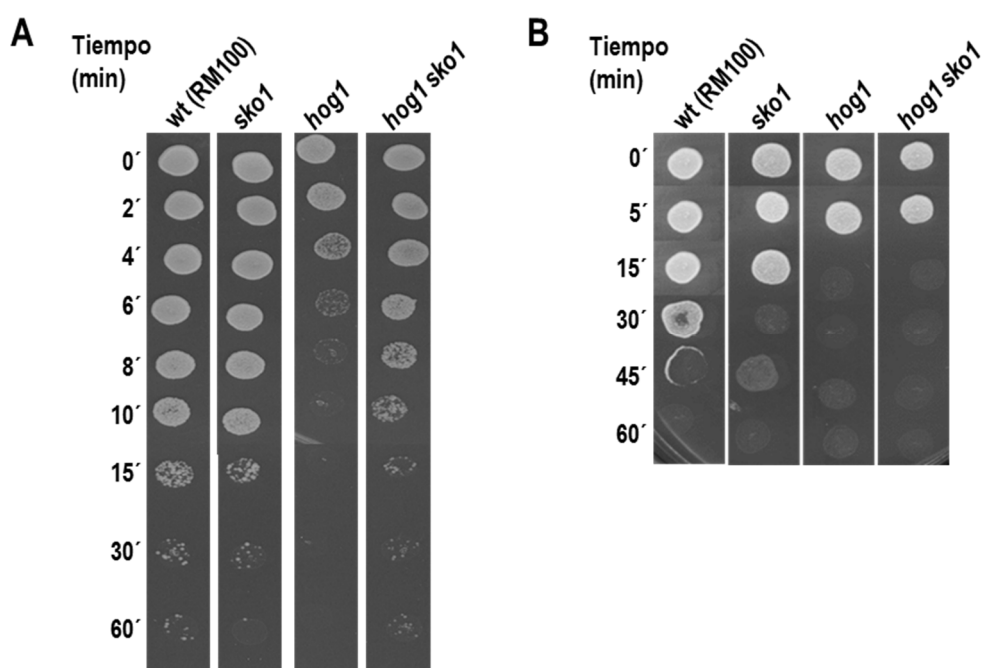


Figura 16. Sensibilidad a H_2O_2 y menadiona de los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* en caída de viabilidad.

Partiendo de cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas de *C. albicans* indicadas se realizaron suspensiones de 10^7 cel/ml a las que se adicionó 50 mM de H_2O_2 (A) o 20 mM de menadiona (B) manteniéndose a $37^\circ C$ y en agitación durante los tiempos indicados para, posteriormente, sembrar 5 μl de las suspensiones y analizar la pérdida de viabilidad. Las placas se escanearon tras 24 horas de incubación a $37^\circ C$.

Por último, determinamos la inhibición del crecimiento de las distintas cepas en presencia de peróxido de hidrógeno y menadiona. La determinación del halo de inhibición se llevó a cabo mediante difusión en placa, empleando discos impregnados con los agentes oxidantes. Estos, fueron impregnados con 5 y 10 μl de 10 M de peróxido de hidrógeno y 1 M de menadiona y colocados en el centro de una placa previamente sembrada con 10^6 células por extensión en superficie y se dejaron incubar durante 24 horas.

Como se muestra en la Tabla 1, en comparación con la cepa silvestre, el mutante *sko1* presenta un halo de inhibición ligeramente superior en presencia de H_2O_2 . Sin embargo, la diferencia en los tamaños de los halos es mayor en presencia menadiona. El doble mutante *hog1 sko1* muestra mayores halos de inhibición frente a ambos compuestos en comparación con el resto de las cepas analizadas. Aunque los datos son próximos, no dejan de ser significativos, ya que pequeñas diferencias en este ensayo reflejan diferencias importantes en términos de sensibilidad/resistencia.

Resultados

CEPAS	HALO DE INHIBICIÓN (MM)			
	10 M H ₂ O ₂		1 M MENADIONA	
	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl
wt	19	36	22	29
sko1	20	37	23	33
hog1	20	38	24	36
hog1 sko1	21	41	26	43

Tabla 1. Tamaño del diámetro de halo de inhibición de crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno y menadiona a diferentes dosis.

Estos resultados, colectivamente, nos indican que Sko1 juega un papel importante en la respuesta a diferentes tipos de estrés y, específicamente, frente a estrés oxidativo.

b) Sko1 media la activación de Hog1 y Mkc1 en respuesta a peróxido de hidrógeno

Debido al fenotipo diferencial de los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* respecto del mutante *hog1* llevamos a cabo ensayos para determinar si la delección de *SKO1* afectaba a la señalización del estrés y al patrón de fosforilación de las MAP quinasas. En *C. albicans* se han descrito rutas de transducción de señales mediadas por MAPK que se activan en respuesta a estrés oxidativo, concretamente a peróxido de hidrógeno. Estas rutas son: la ruta de respuesta a estrés mediada por la MAPK, Hog1 y la ruta de integridad celular mediada por la MAPK Mkc1 (Navarro-García *et al.*, 2005; Alonso-Monge *et al.*, 2003).

Realizamos ensayos de inmunodetección con el fin de analizar el patrón de fosforilación de las MAPKs en los mutantes en estudio. Se partió de cultivos en fase exponencial (D.O. = 1) que fueron expuestos a 10 mM de H₂O₂ y se tomaron muestras a lo largo del tiempo para su posterior análisis. Como se puede observar en la Figura 17, en respuesta a este agente oxidante se induce la fosforilación de Hog1 y de Mkc1, tanto en una cepa silvestre como en un mutante *sko1*. Sin embargo, los niveles de fosforilación de Hog1 así como su duración en el tiempo son menores en el mutante *sko1*. Respecto a Mkc1, observamos un comportamiento parecido a lo que sucede con Hog1, es decir unos niveles de fosforilación inferiores en un mutante *sko1* y una menor duración en el tiempo. Por otro lado, las cepas que tienen delecionado el gen *HOG1* (tanto el mutante sencillo *hog1* como el doble mutante *hog1 sko1*) muestran niveles muy bajos, casi indetectables, de fosforilación de Mkc1, corroborando así lo descrito por nuestro grupo en estudios anteriores (Navarro-García *et al.*, 2005; Arana *et al.*, 2005).

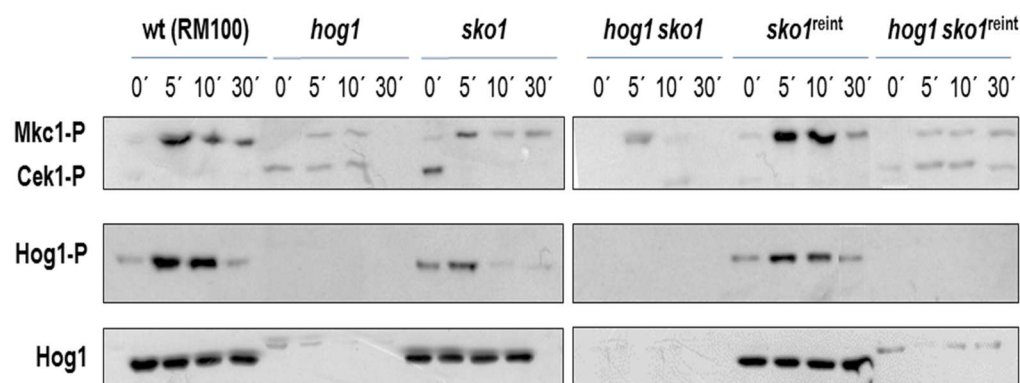


Figura 17. Cinética de fosforilación de las MAP quinasas en respuesta a estrés oxidativo.

Células procedentes de cultivos en fase estacionaria fueron diluidas a D.O. = 0.1 en medio fresco (YPD) e incubadas a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una D.O. = 1 las células fueron sometidas a un tratamiento con 10 mM de H₂O₂ que se adicionó al medio de cultivo. Se recogieron células a los tiempos indicados en la figura, se procesaron y analizaron por *western blot* para la detección de la fosforilación de Hog1 (Hog1-P), Mkc1 (Mkc1-P) y Cek1 (Cek1-P). Como control de carga se incubaron las membranas con un anticuerpo que reconoce la proteína Hog1 total.

Con intención de determinar si se producía una variación significativa del umbral de activación de ambas MAPK en presencia de este tipo de estrés, analizamos también el patrón de fosforilación de las MAP quinasas cuando las células eran expuestas a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Figura 18). Hog1 se fosforila con todas las concentraciones de H₂O₂ ensayadas tanto en la cepa silvestre como en el mutante *sko1*. Los niveles de fosforilación en la cepa silvestre son mayores según aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno, mientras que los niveles de fosforilación en el mutante *sko1* son significativamente más bajos en el rango de concentraciones estudiado. El patrón de fosforilación de Mkc1 es notoriamente diferente entre ambas cepas. En la cepa silvestre la fosforilación de Mkc1 se detectó en todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, en el mutante *sko1* solo se detectó a 5 mM y 10 mM, y además con una intensidad de señal inferior a la observada en la cepa silvestre.

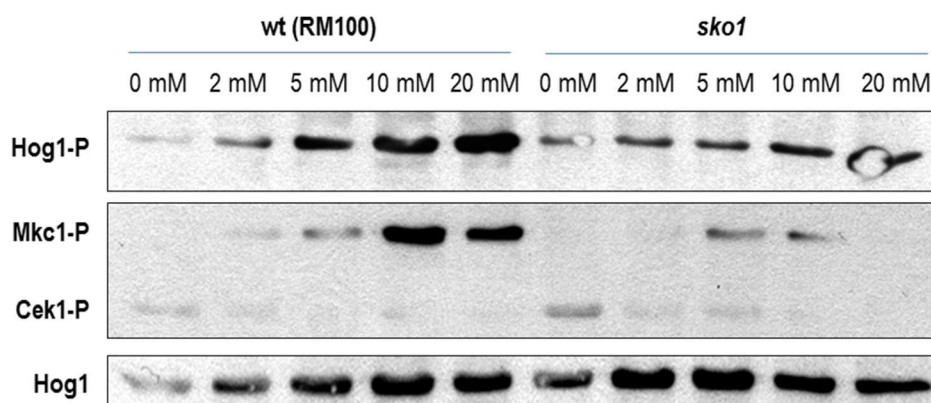


Figura 18. Umbral de fosforilación de las MAP quinasas en presencia de peróxido de hidrógeno.

Células en fase exponencial fueron expuestas durante 10 minutos a las concentraciones de peróxido de hidrógeno indicadas en la figura. Una vez transcurrido el tiempo de exposición se recogieron las células y procesaron para la inmunodetección de la fosforilación de Hog1 (Hog1-P), Mkc1 (Mkc1-P) y Cek1 (Cek1-P). Como control de carga se incubaron las membranas con un anticuerpo que reconoce la proteína Hog1 total.

Estos resultados indican que Sko1 está implicado en la activación de Hog1 y de Mkc1 en respuesta a peróxido de hidrógeno y que su ausencia altera la señalización mediada por Hog1 y Mkc1 en presencia de peróxido de hidrógeno.

c) La expresión de *SKO1* disminuye en respuesta al peróxido de hidrógeno

Dada la implicación de Sko1 en la respuesta a estrés oxidativo nos planteamos cuantificar la expresión de *SKO1* frente a peróxido de hidrógeno. Para ello realizamos una cinética en la que cuantificamos la expresión del promotor *SKO1* fusionado a *CbLUC* frente a una concentración de 10 mM de peróxido de hidrógeno.

En la Figura 19 se muestran los valores relativos de expresión de cada cepa respecto de su basal. Podemos observar un descenso en los niveles de expresión de *SKO1* tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *sko1* y *hog1 sko1*. Sin embargo, este descenso es menor en los mutantes. En un mutante *hog1*, la expresión de *SKO1* se mantiene constante, existiendo por tanto un comportamiento diferente al de la cepa parental siendo esta diferencia significativa a los 15 minutos tras la adición del peróxido de hidrógeno (* = $P < 0.05$).

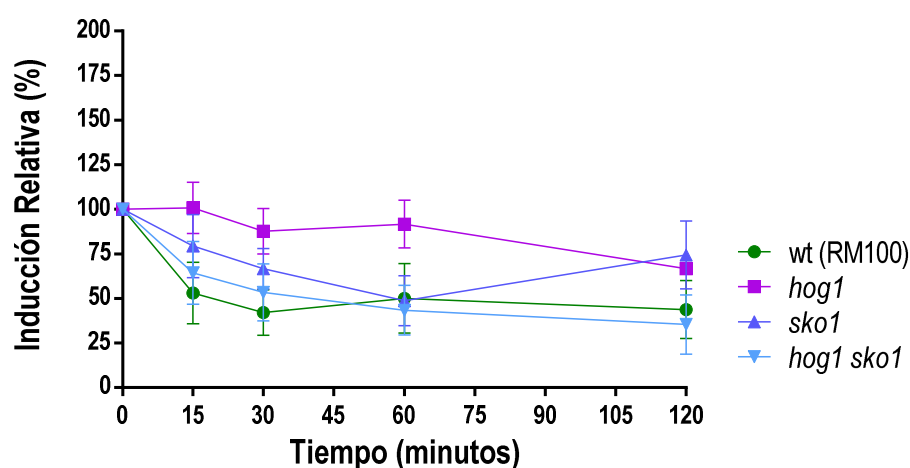
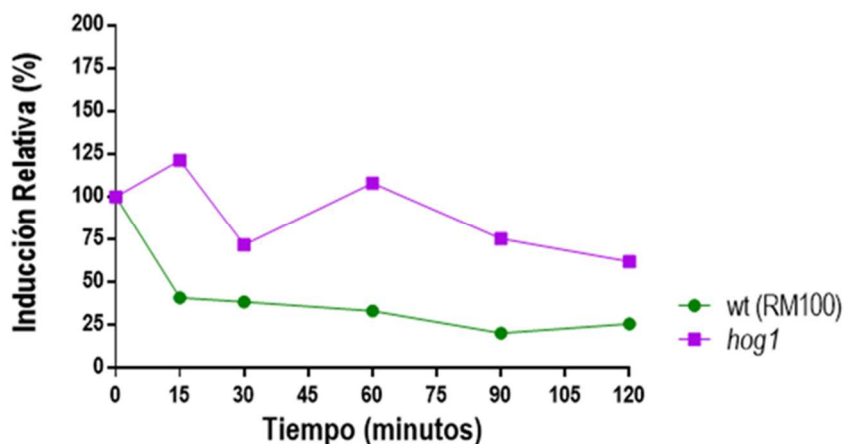


Figura 19. Cinética de expresión de *SKO1^{pr}-CbLUC* en respuesta a estrés oxidativo.

Medida de la expresión de *SKO1^{pr}-CbLUC* en respuesta a 10 mM de H_2O_2 en cepas silvestre y mutantes *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1*. La gráfica representa la inducción relativa de cada cepa respecto a su tiempo 0 o basal. Los datos representan la media y la barra de desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para verificar que el descenso de expresión de *SKO1* es fisiológico y no se debía a que la concentración de 10 mM de H_2O_2 dañe las células o afecte la actividad de la luciferasa, cuantificamos en el mismo ensayo tanto la expresión de *SKO1^{pr}-CbLUC* como la expresión del gen *TRR1p-RLUC*. El gen *TRR1* codifica una tiorreductasa que en trabajos anteriores, se ha empleado como gen reportero para la cuantificación del estrés oxidativo en *C. albicans* tanto en respuesta a estrés oxidativo *in vitro* (en presencia de H_2O_2 , y menadiona) como *ex vivo* (HL-60 y RAW264.7) (Arana *et al.*, 2007).

A



B

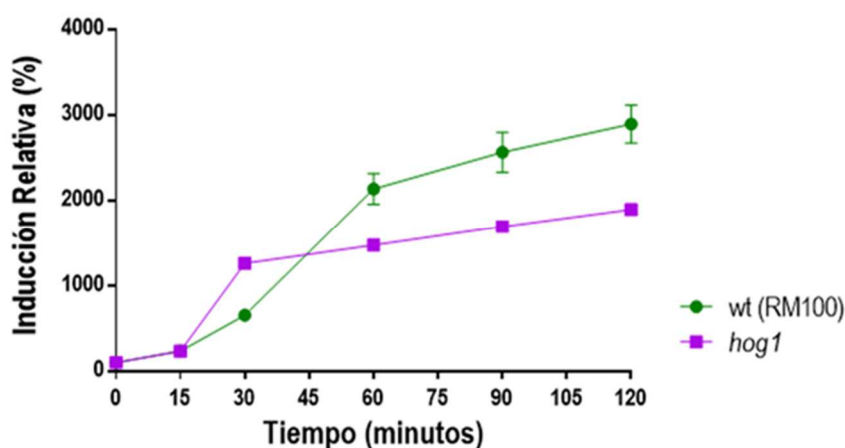


Figura 20. Expresión de *SKO1^{pr}-CbLUC* y *TRR1p-RLUC* en presencia de estrés oxidativo.

Cinética de inducción de *SKO1^{pr}-CbLUC* (A) y del gen *TRR1p-RLUC* (B) en una cepa silvestre y un mutante *hog1* en presencia de 10 mM de H_2O_2 . Cada medida se realizó por triplicado y las gráficas representan la media y desviación estándar de estas tres medidas intraexperimentales.

Como se muestra en la Figura 20, existe una disminución en los niveles de expresión de *SKO1* (A) en la cepa silvestre aunque los niveles de expresión del gen reportero *TRR1* (B) en la misma cepa muestran un aumento considerable. En el caso del mutante *hog1* ocurre lo mismo, y la expresión de *SKO1* se mantiene estable en el tiempo (como se ha descrito en el párrafo anterior) mientras que la expresión de *TRR1* aumenta con el tiempo. Este hecho nos confirma que el descenso en la expresión de *SKO1* no se debe a un daño en las células por exceso de concentración del agente oxidante y sugiere que, *Sko1* pueda actuar como represor de genes de respuesta a este agente oxidante.

III. Estudio de la respuesta transcripcional de Sko1

Tras los resultados obtenidos, se decidió estudiar el papel del factor de transcripción Sko1 en la respuesta transcripcional global frente a estrés oxidativo. Para ello se analizó el patrón de expresión de la cepa silvestre CAF2 y del mutante *sko1*, tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés oxidativo (concretamente a peróxido de hidrógeno) empleando microarrays de DNA (véase más detallado Materiales y Métodos). Estos experimentos se llevaron a cabo en células en fase de crecimiento exponencial creciendo en medio rico YPD a 37°C. Las muestras fueron tomadas cuando la densidad óptica de los cultivos llegó a 1 (véase más detallado en Materiales y Métodos).

a) Sko1 es un represor transcripcional en condiciones basales de crecimiento

Para determinar la función de Sko1 en *C. albicans* analizamos el perfil de expresión del mutante *sko1* comparado con el de la cepa silvestre CAF2 en ausencia de estrés. Tras el análisis estadístico, se reveló que 38 genes estaban inducidos en un mutante *sko1* comparado con la cepa silvestre (ratio *sko1*/CAF2 ≥ 1.5); de estos, 23 genes mostraban ratios superiores a 2. Estos genes, por tanto se encuentran reprimidos por Sko1 en condiciones de crecimiento normales (YPD a 37°C en fase exponencial). Dentro de este grupo de genes que presentan elevados niveles de RNA mensajero en el mutante *sko1*, destacan los relacionados con la pared celular de la hifa (*DDR48*, *CSP37*) y el crecimiento filamentoso (*RBF1*, *GAT2*) así como con la patogénesis (*WH11*, *ALS2*) (Tabla 2). Por el contrario, solo 3 genes se encuentran reprimidos en estas condiciones (ratio *sko1*/CAF2 ≤ 0.5), indicando que estos genes estarían inducidos por Sko1. En cuanto a los genes reprimidos en ausencia de Sko1, se encuentran *HTS1* (histidin RNAt sintetasa), *RPN5* (subunidad reguladora del proteasoma) y *YMR317* (proteína no esencial). Estos datos sugieren que Sko1 en condiciones basales está jugando un papel fundamentalmente represor sobre la expresión de genes involucrados tanto en el desarrollo hifal como en la patogénesis de *C. albicans*.

Resultados

NOMBRE	CGDID/ GEN ID	FUNCIÓN	RATIO <i>sco1</i> vs CAF2
WH11	CAF0006989	Heat shock protein	7,85
ASR2	CAL0003994	Adenylyl cyclase and stress responsive protein;	4,05
AGP2	CAL0003797	Amino-acid permease (by homology)	4,00
SOU1	CAL0005253	Sorbitol utilization protein Sou1p [<i>Candida albicans</i>]	3,91
IPF12897	CAL0006266	Similar to oxidoreductases	3,82
IPF4065	CAL0001729	Possible stress protein; increased transcription associated with CDR1 and CDR2 overexpression	3,20
DDR48	CAL0004933	Stress protein (by homology)	3,09
IPF5981	CAL0004535	Similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gin3p (by homology)	3,03
RBT5	CAL0000618	Repressed by TUP1 protein 5	2,99
IPF4430	CAF0006969	Gene induced by hypoxia and ketoconazole	2,92
IPF12312	CAL0001751	Similar to cell-wall mannoproteins	2,85
CSP37	CAL0002434	Hyphal cell wall protein	2,64
MAL32	CAL0003137	Maltase (by homology)	2,58
FGR51	CAL0003154	Transposon mutation affects filamentous growth	2,41
ATF1	CAL0002439	Putative alcohol acetyltransferase	2,16
IPF6881	CAL0000225	Putative phosphatidyl synthase	2,14
ARA1	CAL0005411	D-arabinose dehydrogenase (by homology)	2,13
-	CAL0003157		2,12
IPF3831	CAL0004081	Unknown function	2,09
ASR1	CAL0000739	Heat shock protein	2,03
RBF1	CAL0006188	Transcription factor; binds RPG-box DNA sequences	2,03
IPF8806	CAL0000651	6-phosphofructose-2-kinase (by homology)	2,00
BRG1	CAL0004848	Transcription factor; recruits Hda1 to hypha-specific promoters	1,93
LSC2	CAL0001726	Beta subunit of succinate-CoA ligase	1,84
GPD2	CAL0001161	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (by homology)	1,82
FRE7	CAL0002145	Ferric reductase transmembrane component (by homology)	1,79
IPF1835	CAL0002437	Unknown function	1,71
SNA2	CAL0005668	Unknown function	1,70
IPF19702.5f	CAL0000980	Unknown function, 5-prime end	1,70
TTR1	CAL0005151	Glutaredoxin (by homology)	1,70
RNR21	CAL0002245	Ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	1,69
ADH7	CAL0006095	Alcohol dehydrogenase (by homology)	1,67
IPF9507.3f	CAL0002796	Ubiquitin-protein ligase activity and role in chromatin modification	1,65
IPF9167	CAL0004219	Carbohydrate kinase domain-containing protein	1,63
EBP1	CAL0003035	NADPH dehydrogenase	1,62
ALS2	CAL0001283	Adhesin	1,60
PIL1	CAL0001950	Echinocandin-binding protein	1,56
TIM9	CAL0004154	Mitochondrial inner membrane translocase (by homology)	1,56
RPN5	CAL0004766	Subunit of the regulatory particle of the proteasome, 3-prime end (by homology)	0,5
YMR317	CAL0006782	Protein not essential for viability	0,5
HTS1	CAL0004839	histidine tRNA synthetase (by homology)	0,47

Tabla 2. Genes cuya expresión se encuentra alterada en un mutante *sco1* en condiciones basales.

En rojo se muestran los genes que se encuentran inducidos y en verde los genes reprimidos en un mutante *sco1* en condiciones normales de crecimiento.

b) La expresión de *WH11* es controlada por *Sko1*

Los resultados obtenidos en los microarrays, revelaron que la expresión del gen *WH11* era más alta en un mutante *sko1* que en la cepa silvestre. Este gen codifica una proteína citoplasmática que se expresa en la fase blanca de las levaduras y además está involucrado en patogénesis, ya que su expresión incrementa la virulencia de las células opacas (Kvaal *et al.*, 1997; Schroppel *et al.*, 1996). En *S. cerevisiae* el homólogo de este gen es *HSP12*, cuya expresión es inducida en respuesta a un choque térmico así como por estrés oxidativo y osmótico entre otras condiciones, siendo regulado por la ruta HOG y por la ruta Ras-PKA (Varela *et al.*, 1995). Por ello decidimos cuantificar su expresión mediante PCR cuantitativa, para lo cual se compararon los niveles de expresión de dicho gen a distintas temperaturas (30°C y 37°C), tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *sko1*, *hog1*, *hog1 sko1* y las cepas reintegrantes.

La expresión del RNA mensajero de *WH11* (Figura 21) es mayor en un mutante *sko1* que en la cepa silvestre a 37°C (~ 7 x), mientras que a 30°C no se aprecian diferencias significativas. El mutante *hog1* muestra niveles de expresión similares en ambas temperaturas, siendo de 3.5 veces superior para 30°C y de 2.9 veces superior para 37°C respecto a la cepa silvestre. Es destacable el hecho de que el doble mutante *hog1 sko1* muestre unos niveles de expresión significativamente más altos que la cepa parental, 11.6 y 18.8 veces para 30°C y 37°C respectivamente. Las cepas reintegrantes *sko1^{reint}* y *hog1 sko1^{reint}* revierten los fenotipos de los mutantes, siendo los niveles de estas superiores en 0.89 y 1.39 veces para las temperaturas de 30°C y 37°C en el caso de la reintegración en el mutante *sko1* y de 4.23 y 3.68 veces para 30°C y 37°C en el caso de la reintegración en el doble mutante (todos ellos con respecto a la cepa parental a 30°C o 37°C).

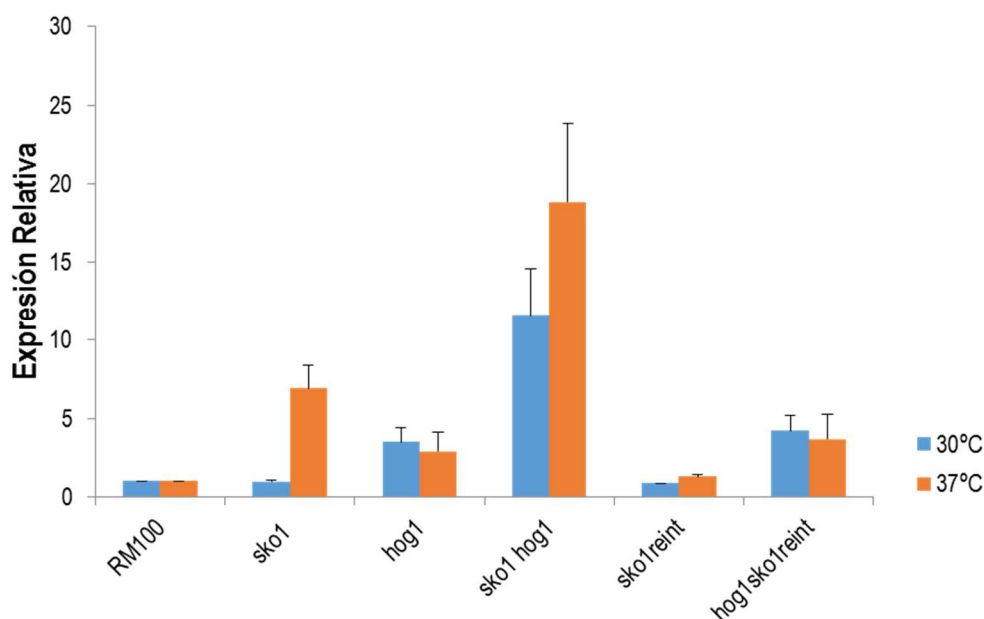


Figura 21. Cuantificación de la expresión del gen *WH11* mediante PCR cuantitativa.

Niveles de expresión de *WH11* cuantificados por PCR cuantitativa a partir de cultivos en fase exponencial incubados a 30°C y 37°C. Como control interno se empleó el RNA del gen *ACT1* y los valores fueron relativizados a la cepa silvestre tanto a 30°C como a 37°C.

Estos datos sugieren que tanto el factor de transcripción Sko1 como la MAP quinasa Hog1 controlan la expresión de *WH11* y que ambos ejercen dicha función por mecanismos parcialmente independientes.

c) Sko1 regula la respuesta transcripcional frente a peróxido de hidrógeno

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis fenotípico de los mutantes en *SKO1* en respuesta a estrés oxidativo, decidimos estudiar el papel de este en la respuesta transcripcional frente a estrés oxidativo. Para ello, mediante el uso de microarrays de DNA se analizaron y compararon los patrones de expresión de la cepa silvestre CAF2 y del mutante *sko1*, en condiciones tanto basales como tras diez minutos de exposición frente a una concentración de 5 mM de peróxido de hidrógeno.

El número de genes cuya expresión es regulada por la adición de peróxido de hidrógeno depende de los criterios con los que se definen los datos como positivos y el análisis estadístico. Para ello, solo consideramos como positivos aquellos genes que presentaban niveles similares en al menos tres de las cuatro hibridaciones cuando las

células eran tratadas con peróxido de hidrógeno y en al menos cuatro de las seis hibridaciones para el caso de las células sin tratar. Con los resultados obtenidos, se consideraron como inducidos aquellos genes cuya expresión poseía un valor mayor de 1.9, mientras que se consideraron como reprimidos aquellos cuyo valor era igual o menor de 0.5.

En el mutante *sko1* se encuentran inducidos 137 genes frente a los 119 genes de la cepa silvestre. De estos, 116 fueron inducidos en ambas cepas; entre ellos se encuentran genes de respuesta a estrés oxidativo, de unión a ATP, matriz mitocondrial, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del metabolismo del hierro entre otros. Por otro lado, el número de genes reprimidos en el mutante *sko1* fueron 149 frente a los 124 de la cepa silvestre y en este caso 103 eran comunes para ambas cepas (Figura 22). Por tanto, estos datos indican que la mayor diferencia en cuanto al perfil transcriptómico entre la cepa silvestre y el mutante *sko1* se observa en aquellos genes que se encuentran reprimidos en respuesta a estrés oxidativo.

Comparamos nuestros perfiles transcripcionales (cepa silvestre y mutante *sko1*) en respuesta a peróxido de hidrógeno con los obtenidos por Enjalbert para el mutante *hog1* (Enjalbert *et al.*, 2006). Obtuvimos que 57 genes fueron inducidos por las tres cepas mientras que tan solo 8 se encontraban reprimidos (Figura 22), lo que sugiere que estos genes deben ser controlados por otros mecanismos ajenos a *Sko1* y *Hog1*.

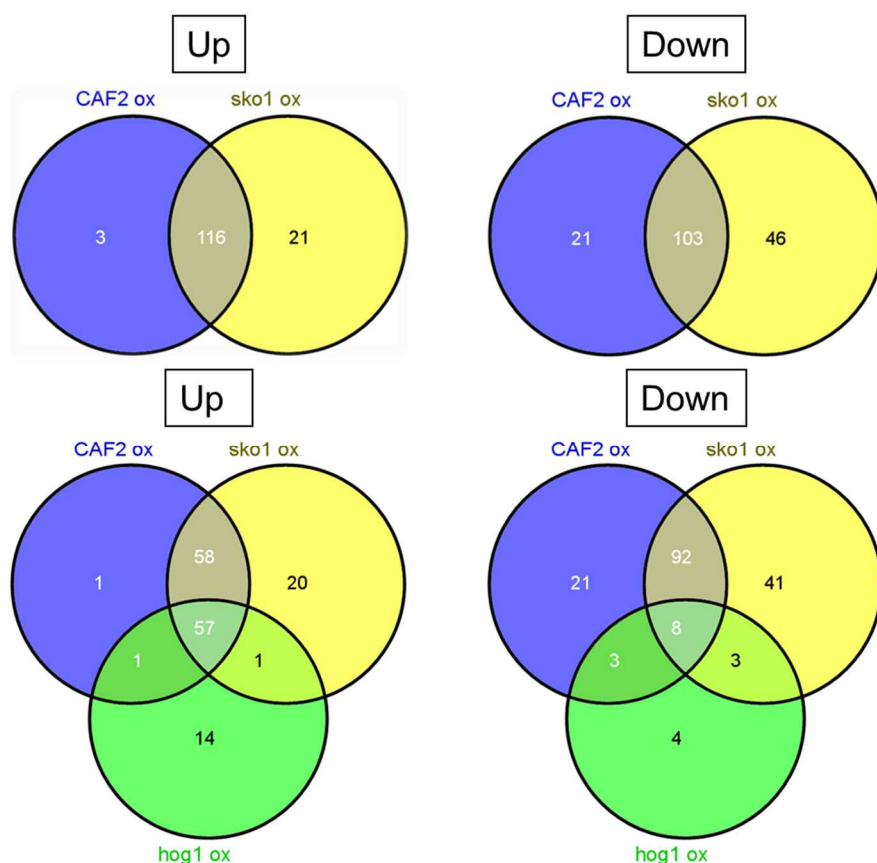


Figura 22. Diagramas de Venn en los que se muestran los conjuntos de genes regulados en respuesta a estrés oxidativo.

Los genes inducidos (up) poseen ratios superiores a 1.9 veces y los reprimidos (down) ratios inferiores a 0.5 comparando con la cepa silvestre. Las intersecciones muestran los genes comunes para ambas cepas. (ox = se refiere al estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno).

En la comparación del mutante *sko1* con la cepa silvestre en respuesta a peróxido de hidrógeno se reveló que, al menos 25 genes eran inducidos en el mutante *sko1* comparado con la cepa silvestre ($\text{ratio } sko1/CAF2 \geq 1.9$) y que de estos 10 mostraban ratios superiores a 3, mientras que 28 genes eran reprimidos en el mutante respecto a la cepa silvestre ($\text{ratio } sko1/CAF2 \leq 0.5$), de los cuales 4 tenían ratios inferiores a 0.3 (Anexo 1, Tabla 1). Los genes inducidos en el mutante *sko1* corresponden mayormente a genes relacionados con el estrés y los reprimidos están relacionados con proteínas ribosomales o proteínas de la superficie celular. Si analizamos y comparamos los datos de los niveles transcripcionales de la cepa silvestre y del mutante *sko1* en condiciones basales y tras la adición del peróxido de hidrógeno ($\text{ratio } sko1 \text{ 10' vs } sko1 \text{ basal}/CAF2 \text{ 10' vs } CAF2 \text{ basal}$), observamos que 28 genes muestran un incremento en los niveles de expresión entre 1.49 y 5.39 veces en el mutante *sko1* con respecto a la cepa silvestre y por el contrario 19 genes se expresan menos en el mutante (Anexo 1, Tabla 2). Cuando comparamos los ratios de la cepa silvestre tratada

y sin tratar y del mutante *sko1* tras el estrés con la cepa silvestre sin tratar hallamos diferencias en la expresión de los genes en unas u otras condiciones, viéndose en unos casos inducidos y en otros reprimidos (Tabla 3) (Anexo 1, Tabla 3).

NOMBRE	CGDID/ GEN ID	FUNCIÓN	CAF2 10' vs CAF2	<i>sko1</i> 10' vs CAF2
<i>RNR21</i>	CAL0002245	Ribonucleoside-diphosphate reductase	0.64	2.54
<i>CSP37</i>	CAL0002434	Hyphal cell wall protein; role in progression of mouse systemic infection	0.46	1.99
<i>IPF4430</i>	IPF4430 //	ORF Predicted by Annotation Working Group	5.59	1.91
<i>CSH1</i>	CAL0001962	Aldo-keto reductase; role in fibronectin adhesion	0.49	1.46
<i>DCK1</i>	CAL0002646	Putative guanine nucleotide exchange factor; required for embedded filamentous growth	2.64	1.27

Tabla 3. Genes cuya expresión está alterada en un mutante *sko1* en condiciones de estrés oxidativo.

En rojo se representan los genes que se encuentran inducidos mientras que en verde se representan aquellos que están reprimidos.

IV. Relación de *Sko1* con la ruta mediada por *Cek1*

a) La delección de *SKO1* conlleva defectos en la pared celular

La pared celular es una barrera física capaz de conferir protección a la vez que soporte estructural, siendo esencial para el desarrollo de las funciones vitales de la célula fúngica. Se trata de una estructura que contiene quitina (β -1,4-N-acetilglucosamida), manoproteínas y β -1,3-glucano y β -1,6-glucano. Existen compuestos como el rojo Congo y el blanco de calcoflúor que son capaces de interaccionar con la pared celular. Esto conlleva una alteración en el ensamblaje de las microfibrillas de quitina y de las cadenas de β -1,3-glucano, afectando por tanto a la formación de la pared celular (Roncero *et al.*, 1988). Estudios previos de nuestro grupo han demostrado la resistencia del mutante *hog1* a estos compuestos (Alonso-Monge *et al.*, 1999), por ello nos planteamos estudiar los efectos de la delección de *SKO1* en la respuesta a dichos compuestos.

Realizamos ensayos de siembra en gota en placas de YPD suplementadas con rojo Congo, blanco de calcoflúor y caspofungina. Estos compuestos intervienen en el correcto ensamblaje de las cadenas de β -1,3-glucano y de las moléculas de quitina en el caso de los dos primeros y como inhibidor de la síntesis de β -1,3-glucano en el caso de la caspofungina. En la Figura 23 podemos observar cómo el mutante *sko1* es claramente más sensible a estos compuestos en comparación con la cepa silvestre. Al igual que sucede con

Resultados

el estrés osmótico el doble mutante *hog1 sko1* posee un fenotipo intermedio, revirtiendo la resistencia del mutante *hog1* a rojo Congo. La reintegración de *SKO1* en los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* revierte los fenotipos de sensibilidad de éstos, asemejándose a la resistencia de la cepa silvestre y del mutante *hog1* respectivamente. Estos datos sugieren que *Sko1* juega un papel en la biogénesis de la pared celular diferente a como lo hace *Hog1*.

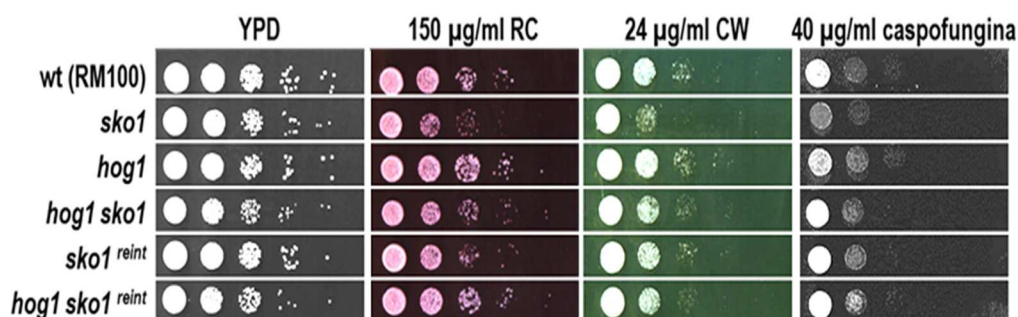


Figura 23. Susceptibilidad a compuestos que alteran la pared celular.

Siembra en gota de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial en placas de YPD suplementadas con rojo Congo (RC), blanco de calcoflúor (CW) y caspofungina a las concentraciones indicadas en la figura. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y posteriormente fueron escaneadas.

b) La hiperfosforilación de *Cek1* detectada en mutantes *hog1* es independiente de *Sko1*

En nuestro grupo, hemos descrito cómo *Cek1* es fosforilada en condiciones de crecimiento activo tras la dilución de un cultivo en fase estacionaria en medio fresco, remodelación de la pared celular así como en respuesta a rojo Congo o caspofungina (Román *et al.*, 2009a; Román *et al.*, 2005). Esta fosforilación es dependiente de *Sho1*, de *Msb2* y *Opy2* (Herrero de Dios C. *et al.*, 2013; Román *et al.*, 2009b; Román *et al.*, 2005). Dado que *Sko1* también parece estar involucrado en la biogénesis de la pared celular, nos preguntamos cómo afectaría la delección de *SKO1* a la fosforilación de *Cek1*, para lo cual analizamos el patrón de fosforilación de *Cek1* en salida de fase estacionaria, condiciones que se sabe estimulan su fosforilación. Partimos de cultivos en fase estacionaria que se diluyeron en medio fresco atemperado y se incubaron a 37°C durante una hora recogiendo muestras a los 15 y 60 minutos.

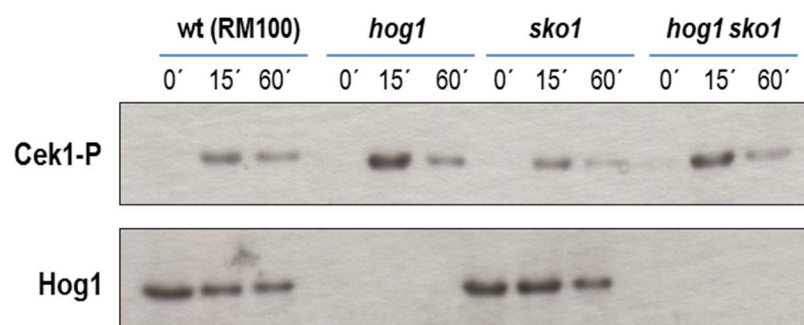


Figura 24. Patrón de fosforilación de Cek1 en mutantes *sko1* en salida de fase estacionaria.

Inmunodetección de la MAP quinasa Cek1 en salida de fase estacionaria. Se partió de cultivos en fase estacionaria que se refrescaron en medio YPD atemperado y se incubaron de nuevo a 37°C. Tras la recogida de muestras a los tiempos indicados, se procesaron y analizaron por *western blot* para la detección de los niveles de fosforilación de Cek1 (Cek1-P). Como control de carga se incubaron las membranas con anticuerpos que reconocen la proteína Hog1 total.

Tal y como se observa en la Figura 24, en todas las cepas analizadas existe una activación de Cek1 tras la dilución de los cultivos. El patrón de fosforilación de esta MAPK es muy similar en todas las cepas, aunque son ligeramente más altos en los mutantes *hog1* y *hog1 sko1*. Por tanto, la fosforilación de Cek1 es independiente tanto de la MAPK Hog1 como del factor de transcripción Sko1.

c) La inducción de la expresión de *CEK1* en salida de fase estacionaria depende de Hog1 y de Sko1

Dado que la expresión de *SKO1* depende de la ruta mediada por Cek1 en respuesta a caspofungina (Rauceo *et al.*, 2008) nos planteamos si la expresión de *CEK1* podría depender de Sko1 y de otros elementos de la ruta HOG. La ruta mediada por Cek1 está implicada en la biogénesis de la pared celular y su función parece estar no solo regulada por fosforilación sino que también a nivel transcripcional (Román *et al.*, 2009a; Román *et al.*, 2005). La expresión de esta MAP quinasa está regulada tanto por la temperatura como por la presencia de tunicamicina (Román *et al.*, 2009b) y también se induce en salida de fase estacionaria (R. Alonso-Monge, sin publicar).

Para analizar la expresión de *CEK1*, estudiamos el comportamiento en condiciones de salida de fase estacionaria, condiciones que se han descrito que inducen la transcripción y activación de Cek1 (Román *et al.*, 2009b). Para ello, integramos la construcción que contiene la región promotora del gen *CEK1* al gen de la luciferasa *CbLUC* en una cepa silvestre y en los mutantes *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1* (véase más detallado en Materiales y

Resultados

Métodos). Realizamos una salida de fase estacionaria; una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, fueron diluidos en medio YPD atemperado a una D.O. = 0.1 y se fueron recogiendo muestras a lo largo de 2 horas.

Como se muestra en la Figura 25, existe una inducción de la expresión de *CEK1* en salida de fase estacionaria (30 minutos) en todas las cepas que perdura a lo largo del tiempo. Dicha inducción es mayor para la cepa silvestre en comparación con los mutantes, siendo máxima a los 60 minutos. Aunque en todas las cepas se detecta un incremento en la expresión de *CEK1* las diferencias de expresión son significativas a partir de la primera hora tanto en el mutante *hog1* como en el mutante *sko1* en comparación con la cepa silvestre (* = $P < 0.05$). La inducción de la expresión de *CEK1* es menor en estos mutantes, lo que sugiere que tanto Hog1 como Sko1 están implicados en la regulación de la transcripción de *CEK1* en salida de fase estacionaria.

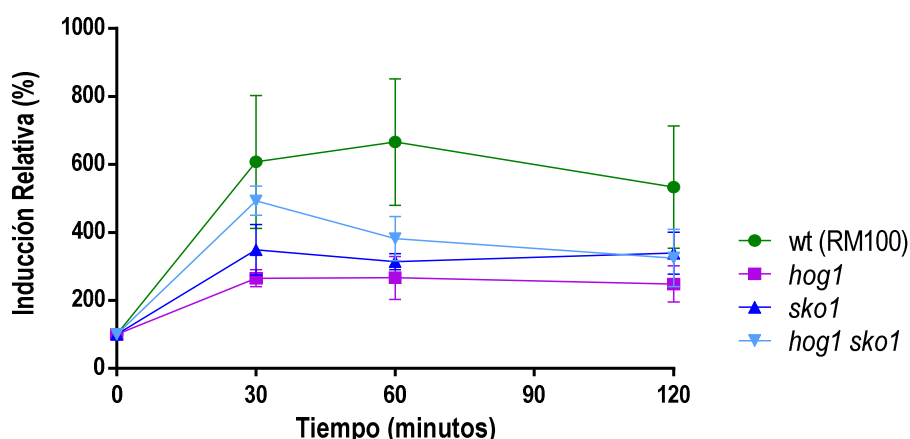


Figura 25. Cuantificación de la expresión de *CEK1^{pr}-CbLUC* en salida de fase estacionaria.

Cinética de expresión del promotor *CEK1^{pr}-CbLUC* en salida de fase estacionaria en una cepa silvestre y en los mutantes *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1*. Las muestras fueron recogidas a tiempo 0 (fase estacionaria) y a los 30, 60 y 120 minutos tras diluir los cultivos a D.O. = 0.1 e incubarlos a 37°C. Las muestras fueron procesadas como se indica en Materiales y Métodos para así cuantificar la luminiscencia. Los datos representan la inducción de la expresión respecto al tiempo cero de cada cepa. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Cuando los datos se relativizan respecto al basal de la cepa silvestre (Figura 26), se ponen de manifiesto diferencias en los niveles basales de expresión de *CEK1* en las distintas cepas. Tras realizar el análisis estadístico de una ANOVA de dos vías, observamos que dichas diferencias no son significativas, al igual que ocurre con el mutante *sko1* (Figura 26.A). Por el contrario, existen diferencias significativas si comparamos el comportamiento

del mutante *hog1* a los 60 y a los 120 minutos con la cepa parental (* = $P < 0.05$). También como se refleja en el panel B de la Figura 26 las diferencias entre el doble mutante *hog1 sko1* y la cepa parental son muy significativas a partir de los 30 minutos del ensayo y hasta el final del mismo (** = $P < 0.01$). Estos resultados indican que la expresión de *CEK1* es más alta en el doble mutante *hog1 sko1* y, por tanto, Hog1 y Sko1 regulan la expresión de *CEK1*.

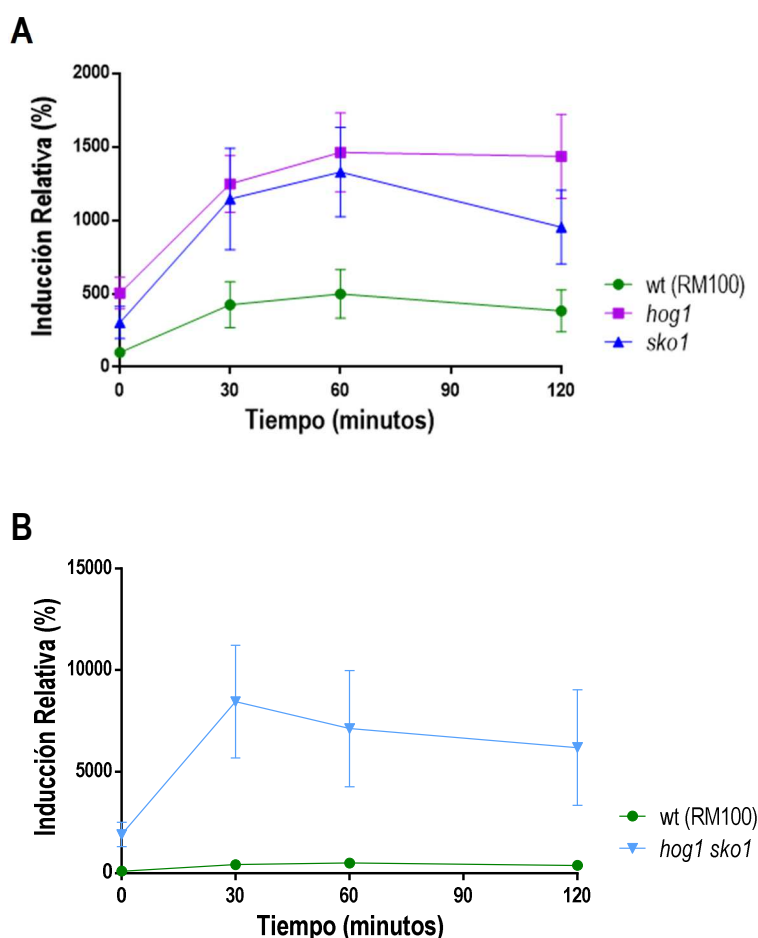


Figura 26.
Inducción de la expresión de *CEK1^{pr}-CbLUC* en salida de fase estacionaria relativizado al basal de la cepa silvestre.

En la gráfica se representó la inducción relativa de cada cepa respecto al tiempo cero de la cepa silvestre. (A) Comparación de los mutantes *hog1* y *sko1* con la cepa silvestre (RM100). (B) Comparación entre la cepa silvestre (RM100) y el doble mutante *hog1 sko1*. Se muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

B. Estudio de la función de Sko1 en morfogénesis

C. albicans es un hongo polimórfico capaz de pasar de un estado levaduriforme a un estado hifal. Esta capacidad de filamentación juega un papel muy importante en la virulencia, siendo inducida en respuesta a compuestos como la N-acetilglucosamina o la D-glucosa presente en el suero, así como por altas temperaturas (37°C) y un pH neutro.

La ruta HOG está íntimamente relacionada con la capacidad de filamentación de *C. albicans*, siendo Hog1 un represor de la transición levadura-hifa (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Por ello, nos planteamos estudiar el papel que desempeña Sko1 en la morfogénesis de *C. albicans*, mediante ensayos para determinar la capacidad de filamentación en medio líquido así como la morfología colonial en medio sólido.

I. Análisis de la filamentación en medio líquido

El suero es uno de los principales inductores de la filamentación y uno de los factores más relevantes a nivel fisiológico; por ello, usamos este componente para los ensayos que llevamos a cabo.

Para el estudio del papel de Sko1 en la transición levadura-hifa, partimos de 10^6 células creciendo en medio rico YPD al que se adicionó un 5 % de suero como condición subinductora. Usamos también 100 % como condición inductora de la filamentación. Ambas muestras las incubamos durante 3 horas a 30°C y 37°C.

Como puede observarse en la Figura 27, el mutante *sko1* muestra una capacidad de filamentación mayor que la observada en la cepa silvestre, formando verdaderas hifas incluso en condiciones subinductoras y a 30°C de temperatura. Esta capacidad de llevar a cabo la transición levadura-hifa también se aprecia en el doble mutante *hog1 sko1*, siendo esta mayor que en el mutante *hog1* ya que es capaz de filamentar en todas las condiciones ensayadas. Por el contrario, cuando reintegramos *SKO1* los fenotipos se revierten.

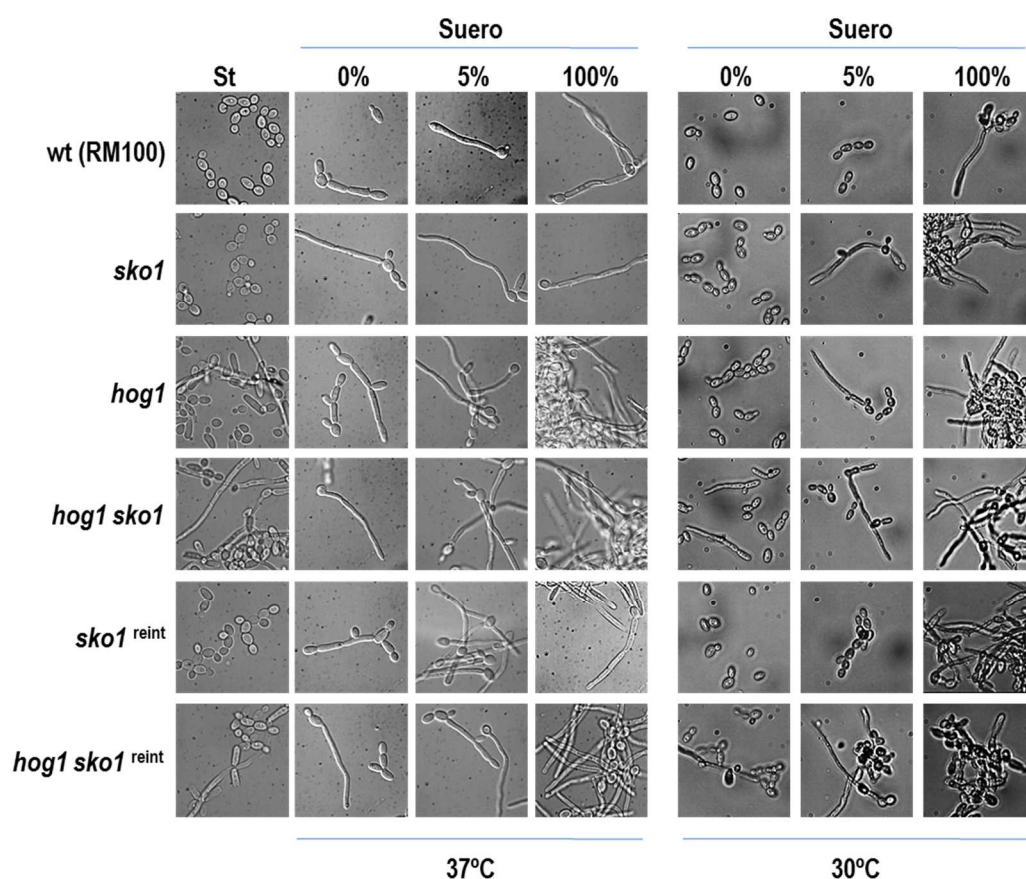


Figura 27. Capacidad de filamentación en medio líquido de los mutantes *sko1*.

10⁶ células procedentes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento, fueron inoculadas en medio YPD en presencia de un 5 y un 100 % de suero e incubadas a 30°C y 37°C durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo se tomaron fotografías.

Debido a los resultados obtenidos, decidimos comprobar si el pH tenía efectos en la transición dimórfica de nuestros mutantes, ya que éste posee un efecto regulador sobre el dimorfismo de *C. albicans* (Buffo *et al.*, 1984). En medios con pH ácido (pH = 4.3) las células se expanden formando yemas elipsoidales que se separan de la célula madre y continúan creciendo en forma de levadura, mientras que a pH neutro (pH = 6.7) las células presentan evaginaciones que se elongan formando hifas. Por tanto, el efecto del pH del medio afecta a los mecanismos generales de la transición dimórfica de las células lo que origina diferencias morfológicas (Soll, 1986).

Para este tipo de análisis en lugar de emplear un medio complejo como el YPD empleamos un medio definido de tipo SD con un pH = 4.3 suplementado con un 5 % de suero e incubadas a 37°C. En estas condiciones, y tal y, como puede observarse en la Figura 28, el mutante *sko1* posee un comportamiento similar a la cepa silvestre siendo

Resultados

incapaz de filamentar, mientras que tanto el mutante *hog1* como el doble mutante *hog1 sko1* sí son capaces de hacerlo en estas condiciones.

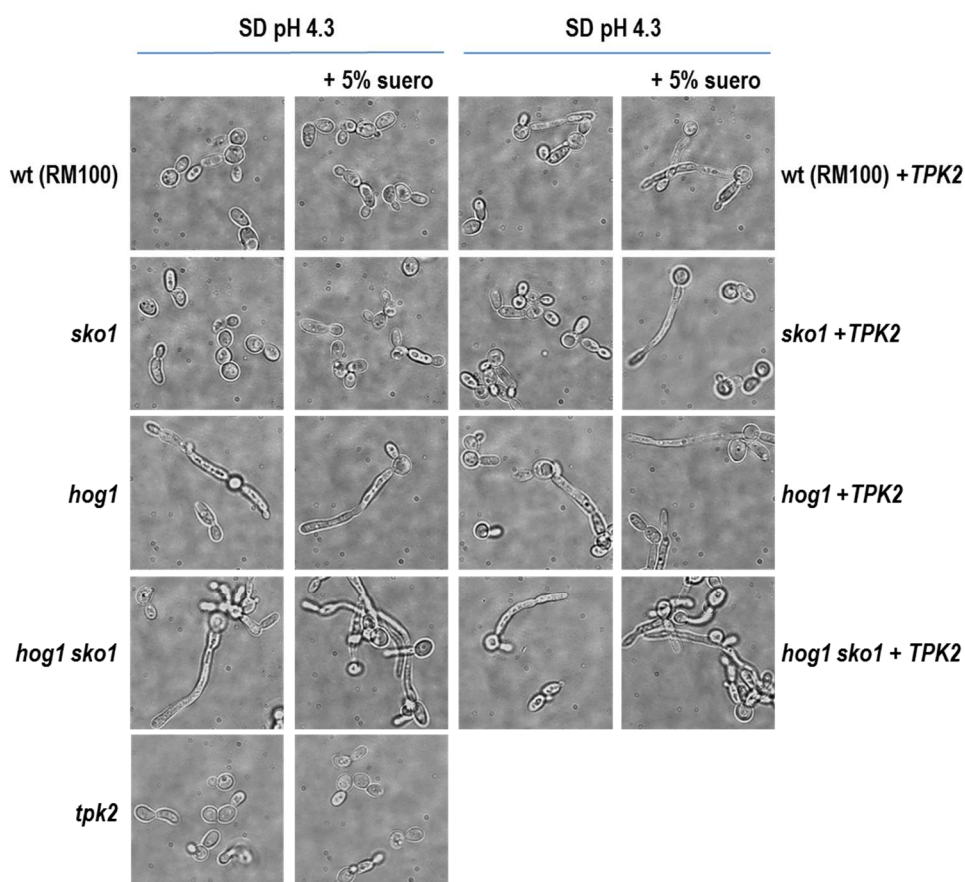


Figura 28. Efecto del pH y de la sobreexpresión de *TPK2* en la transición dimórfica.

Células en fase estacionaria fueron refrescadas en medio SD con un pH = 4.3 y suplementado con 5 % de suero e incubadas a 37°C. Tras 3 horas de incubación se realizaron las fotografías.

En *C. albicans* la ruta cAMP/PKA juega un papel muy importante en el desarrollo hifal y en la virulencia, ya que muchos mutantes en elementos de esta ruta ven alterada su capacidad de filamentación y su virulencia (Bockmuhl *et al.*, 2001). Esta ruta tiene entre sus componentes una adenilato ciclasa Cdc35 que se encuentra asociada a la proteína Cap1, requeridas ambas para el desarrollo hifal bajo condiciones inductoras de filamentación (Bahn and Sundstrom, 2001). La actividad de la adenilato ciclasa está regulada por dos proteínas G, Ras1 y Gpa2. PKA está compuesta por una subunidad reguladora Bcy1 y dos subunidades catalíticas, Tpk1 y Tpk2 (Cassola *et al.*, 2004). Los mutantes *tpk2* poseen una clara incapacidad para llevar a cabo la transición morfológica, por lo que se ha determinado que la subunidad catalítica Tpk2 es un factor muy importante en la regulación del dimorfismo

(Sonneborn *et al.*, 2000). Además, en *C. albicans* existe una interacción entre esta ruta y la ruta de las MAP quinasas implicada en la morfogénesis. Esto es debido a que Ras1 pertenece a ambas rutas y activa ambas, ya que en el caso de la MAP quinasa activa a Cdc42, la cual activa a Cst20 que activa el módulo de las MAP quinasas. Por ello, nos planteamos estudiar la posible relación entre Sko1 y la ruta PKA, para lo cual sobreexpresamos el gen *TPK2* que codifica la subunidad catalítica en las diferentes cepas.

Los resultados obtenidos con la sobreexpresión de *TPK2* (Figura 28), muestran como ésta induce la filamentación tanto en la cepa silvestre como en el mutante *sko1* en condiciones subinductoras. Por lo tanto, Sko1 no tiene un papel esencial en la filamentación mediada por *TPK2*, lo que sugiere que existen otros factores implicados en dicha respuesta.

II. Morfología colonial y capacidad de invasión

El estudio de la morfología colonial en medios sólidos puede proporcionar información acerca de la adaptación a la disponibilidad nutricional en dichos medios. Para este tipo de estudios se emplean dos medios de cultivo: por un lado el medio SLADH (*Synthetic Low Ammonium Dextrose Histidine*), pobre en nitrógeno, y por otro lado, el medio Spider que contiene manitol como fuente de carbono (Liu *et al.*, 1994), ambos son inductores del crecimiento filamentoso e invasivo en *S. cerevisiae* y *C. albicans*.

Para llevar a cabo estos análisis se sembraron entre 50-100 células de la cepa silvestre así como de los mutantes *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1* en medio rico (YPD), SLADH y Spider, y las placas se incubaron a 37°C durante una semana.

Como se observa en la Figura 29, en medio YPD todas las cepas se comportan de manera similar, aunque en el caso del mutante *hog1* se observaron colonias con bordes filamentosos e invasivos. En medio Spider no se observan diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *sko1*, presentando ambas cepas un aspecto rugoso con bordes lobulados y filamentosos. Sin embargo, el doble mutante *hog1 sko1* presenta de nuevo un fenotipo intermedio, pareciéndose al mutante *sko1* en el aspecto rugoso de la colonia y al mutante *hog1* en la carencia de un borde filamentosos. En el medio SLADH el mutante *hog1* presenta bordes mucho más invasivos y ramificados que el resto de cepas incluido el doble mutante *hog1 sko1* más al mutante *sko1*. Estos resultados muestran como ambos genes, *HOG1* y *SKO1*, tienen una función en la morfología colonial en distintos medios.

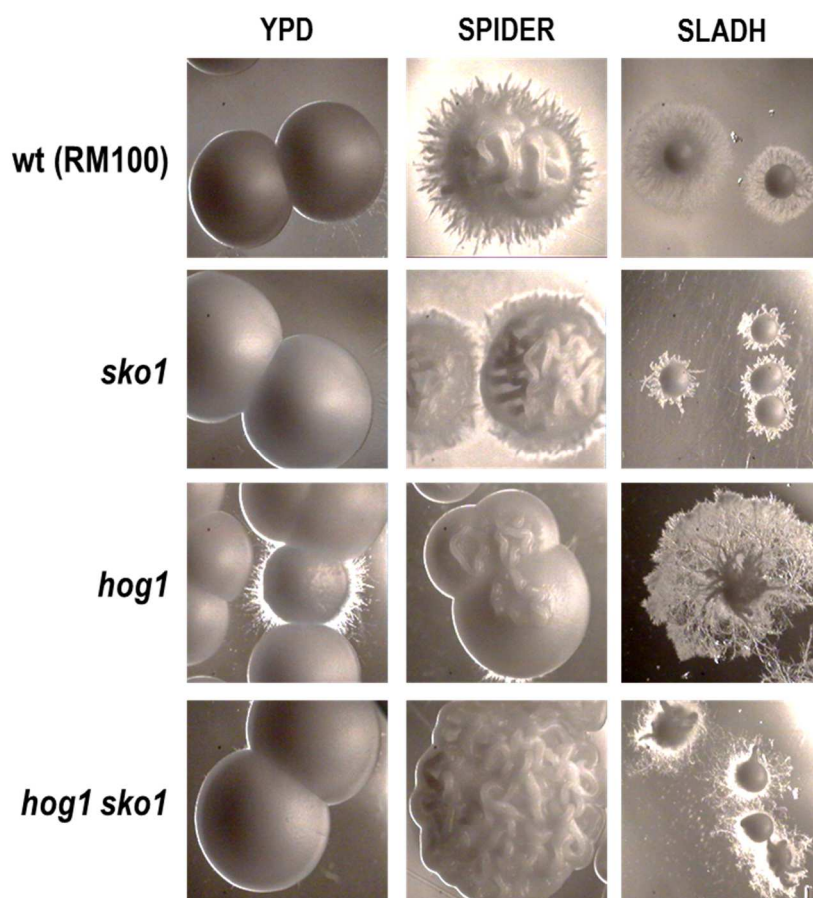


Figura 29. Morfología colonial de mutantes *SKO1*.

A partir de cultivos creciendo en fase exponencial (D.O. = 1) se sembraron entre 50-100 células por placa y se crecieron a 37°C hasta que las colonias alcanzaron el tamaño adecuado para su estudio (7 días).

Por otro lado, estudiamos también el comportamiento de nuestras cepas (cepa silvestre, *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1*) con la sobreexpresión de *TPK2*. En la Figura 30 se constata el mismo comportamiento que el observado en medio líquido. La sobreexpresión de *TPK2* induce un crecimiento filamentosos e invasivo de las cepas ensayadas en medio YPD. Por su parte, el mutante *tpk2* en medio sólido no posee dicha capacidad (Bockmuhl *et al.*, 2001). Estos mismos resultados son observados cuando crecemos estas mismas cepas en medio Spider y SLADH (datos no mostrados).

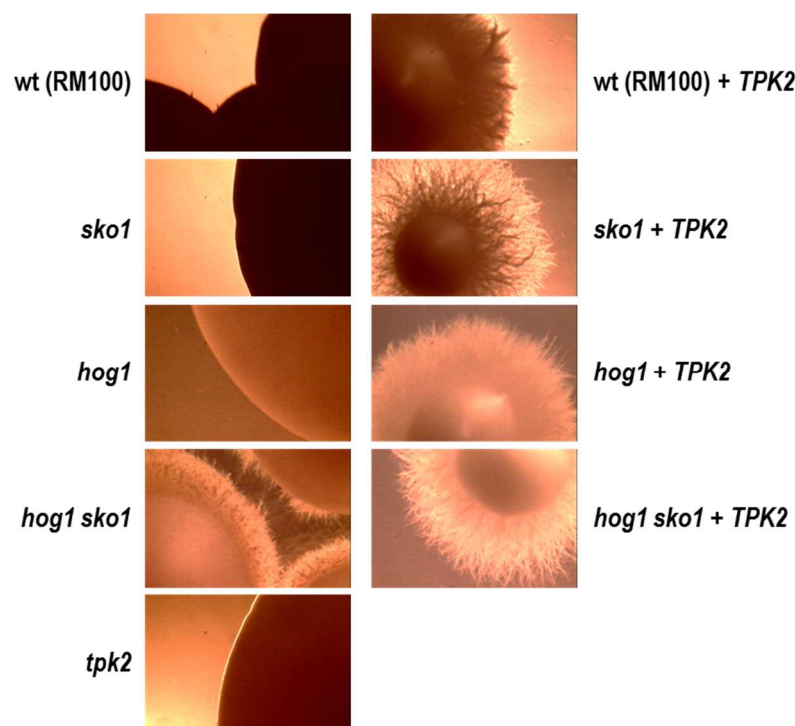


Figura 30. Morfología del borde colonial en cepas que sobreexpresan *TPK2*.

A partir de cultivos creciendo en fase exponencial (D.O. = 1) se sembraron entre 50-100 células por placa en medio YPD. Se incubaron a 37°C hasta que las colonias alcanzaron el tamaño adecuado (7 días) y se fotografiaron.

Estos datos sugieren que *Sko1* actúa como represor de la transición levadura-hifa por un mecanismo que es parcialmente dependiente de *Hog1* e independiente de *Tpk2*.

III. Expresión de genes relacionados con la transición dimórfica

En el estudio transcriptómico realizado por Enjalbert en 2006 (Enjalbert *et al.*, 2006) se observó que en un mutante *hog1* se inducían dos genes (*ECE1* y *HWP1*) relacionados con la transición dimórfica. *ECE1*, codifica una proteína específica de la hifa y regulado por *Rfg1*, *Nrg1*, *Tup1*, *Cph1*, *Efg1* y *Hog1*, mientras que *HWP1* codifica una proteína específica de la pared celular de la hifa. Nosotros quisimos cuantificar la expresión de estos genes para determinar si su transcripción dependía de *Sko1*.

Para llevar a cabo dicha cuantificación se realizaron PCR cuantitativas a partir de cultivos en fase exponencial a temperaturas de incubación de 30°C y 37°C de la cepa parental (RM100) y de los mutantes *sko1*, *hog1* y *hog1 sko1*. Como control interno del ensayo se usó la expresión de gen de la actina *ACT1* y los valores se normalizaron respecto a la cepa silvestre para cada temperatura.

Resultados

En la expresión tanto de *ECE1* (Figura 31.A) como de *HWP1* (Figura 31.B) no se aprecian diferencias significativas entre el mutante *sko1* y la cepa silvestre a 30°C. Sin embargo, a 37°C las diferencias de expresión de ambos genes son mayores, ya que el mutante *sko1* presenta unos niveles de expresión elevados (8.47 veces para *ECE1* y 5.85 veces para *HWP1*) respecto a la cepa silvestre. El mutante *hog1* muestra altos niveles de expresión para ambos genes tanto a 30°C como a 37°C. El doble mutante *hog1 sko1* tiene comportamientos diferentes en ambas temperaturas. A 30°C muestra unos niveles de expresión intermedios, ya que los niveles de expresión de *ECE1* y de *HWP1* son más altos que los mostrados por el mutante *sko1* pero inferiores a los del mutante *hog1*. A 37°C la expresión de ambos genes es mayor que en el resto de las cepas. Cuando integramos la fusión *SKO1*-GFP en el genoma de los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* observamos que los niveles de expresión se revierten a los valores de la cepa silvestre y del mutante *hog1* respectivamente.

Estos datos indican que *Sko1* juega un papel importante como regulador de la expresión de *ECE1* y *HWP1* a 37°C, ya que a esta temperatura se observan diferencias significativas en la expresión de ciertos genes relacionados con el crecimiento de las hifas. Además, *Hog1* parece influir igualmente en la expresión de dichos genes en ambas temperaturas. Por lo tanto, *Sko1* y *Hog1* controlan la expresión de genes de crecimiento filamentoso, pero probablemente de forma independiente.

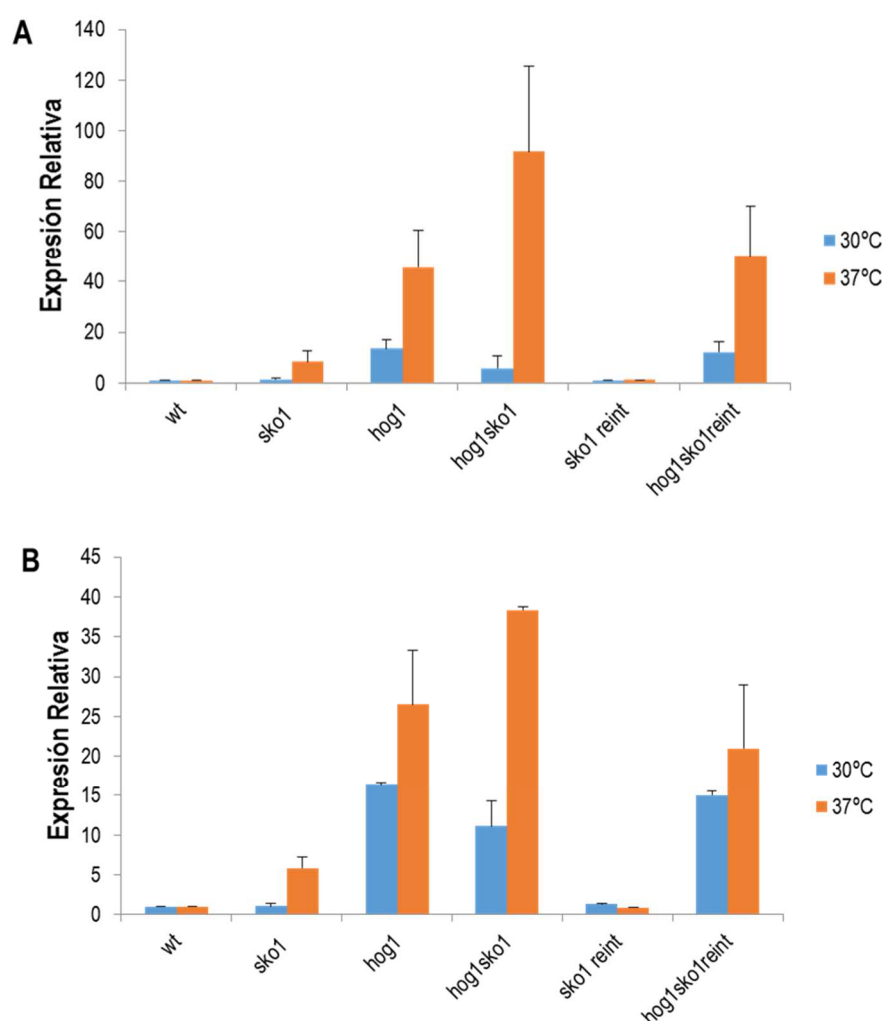


Figura 31. Expresión de genes relacionados con el desarrollo hifal.

Cuantificación de la expresión de los genes (A) *ECE1* y (B) *HWP1* mediante PCR cuantitativa de cultivos en fase exponencial incubados a 30°C y 37°C. Como control interno se empleó la expresión del gen *ACT1* y los datos están relativizados respecto a la cepa silvestre (wt). Los datos representan la media y la barra la desviación estándar de tres experimentos independientes.

C. Estudio de mutantes *sko1* en modelo de colonización en ratón

En nuestro grupo se ha desarrollado un modelo de colonización en ratón, el cual ha permitido el estudio del comportamiento de algunos componentes de la ruta HOG en colonización (Prieto *et al.*, 2014). Dichos ensayos han demostrado que los mutantes de dicha ruta, concretamente la MAPKK *pbs2* y la MAPK *hog1*, son incapaces de colonizar el tracto gastrointestinal del ratón (Prieto *et al.*, 2014). Como el factor de transcripción *Sko1* es dependiente de *Hog1* para la respuesta a estrés osmótico (Rauceo *et al.*, 2008; Enjalbert *et al.*, 2006), nos planteamos estudiar su posible papel en la colonización gastrointestinal.

Resultados

La respuesta del factor de transcripción *Sko1* se estudió mediante la realización de experimentos de competición del mutante *sko1* y del doble mutante *hog1 sko1* con la cepa parental. Para dichos ensayos se marcaron los mutantes con la proteína roja fluorescente dTOM2 (Prieto *et al.*, 2014) (*sko1*-dTOM2, *hog1 sko1*-dTOM2) y la cepa parental RM100 se marcó con la proteína fluorescente verde GFP, este marcaje de las cepas nos permitió llevar a cabo el seguimiento de la colonización. Tras preparar el inóculo con la mezcla de la cepa parental y el mutante a estudiar, se administró a los ratones previamente tratados con una mezcla de antibióticos (véase más detallado en Materiales y Métodos). La evolución de la colonización de las cepas se siguió a lo largo de 24 días analizando el nivel de colonización por recuento en placa a partir de las heces.

Los resultados obtenidos (Figura 32.A) muestran que el mutante *sko1* es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal. Dicha colonización alcanza los mismos niveles que la cepa parental (RM100) y es capaz de mantenerse de forma estable en el tiempo. Es a partir del día 14 cuando ambas cepas empiezan a presentar menores niveles de colonización aunque se mantiene la colonización a niveles detectables para ambas cepas hasta el final del ensayo (día 24).

Por otro lado, observamos el efecto contrario en el comportamiento del doble mutante *hog1 sko1* ya que éste no es capaz de establecerse en el tracto gastrointestinal (Figura 32.B). Observamos cómo tras la inoculación presenta niveles altos a día 1 que rápidamente descienden hasta no ser capaces de detectarlos a día 3 en dos de los tres ratones en los que se realiza el ensayo. Estos datos indican que *Sko1* es prescindible para la colonización gastrointestinal por parte de *C. albicans* en un modelo *in vivo* de ratón. La ausencia de *Hog1* es suficiente para impedir que dicho mutante se establezca como comensal y, la delección de *SKO1* en este fondo mejora parcialmente su capacidad de colonizar el intestino murino.

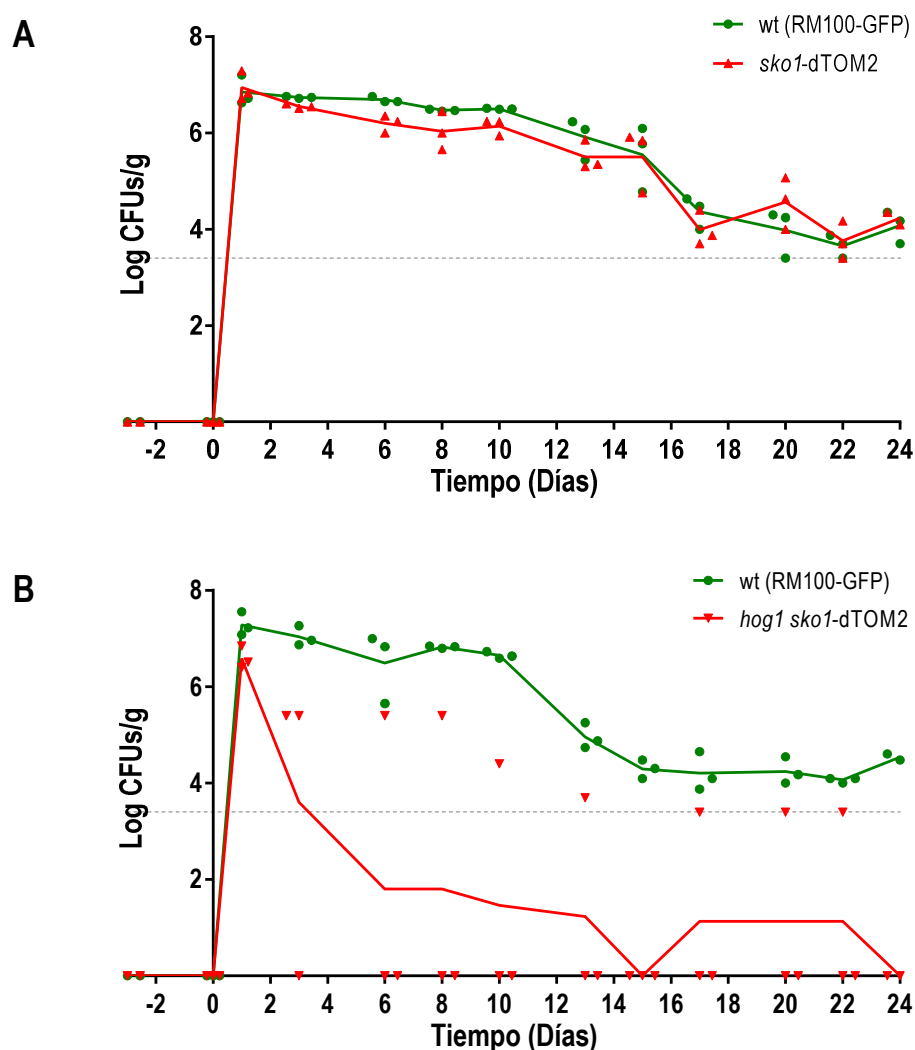


Figura 32. Capacidad de colonización de mutantes en *SKO1* en competición con su parental.

Representación de los valores medios de UFCs correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). El color verde implica la expresión de GFP y el rojo la expresión de dTOM2 (RFP). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección (línea discontinua). Cada valor representa un animal.

Una vez acabados los ensayos de colonización *in vivo* realizamos un ensayo *post mortem* para comprobar la presencia de las cepas en el lumen intestinal. Los resultados de dichos ensayos mostraron la presencia del mutante *sko1* (Figura 33.A) en todas las porciones analizadas y en una proporción similar a la cepa parental. Sin embargo, el doble mutante *hog1 sko1* no se halló en ninguna de las partes analizadas corroborando así la menor capacidad de este mutante para colonizar el tracto gastrointestinal como habíamos descrito en el ensayo de colonización (Figura 33.B).

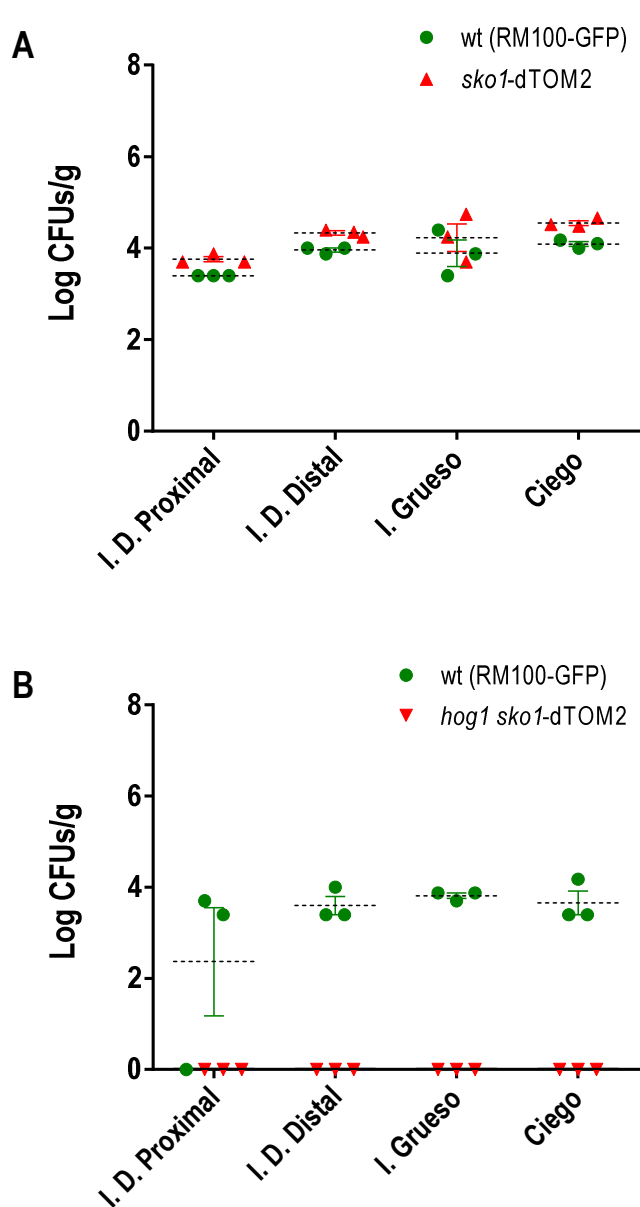


Figura 33. Presencia de la cepa parental y los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* en el lumen intestinal.

Gráfica que representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto intestinal. Se determinó por siembra en medio sólido y recuento de UFCs de la muestra. Cada valor representa un animal.

(A) Los círculos indican cepa parental (RM100), mientras que los triángulos representan al mutante *sko1*.

(B) La cepa parental (RM100) se representa como círculos y el doble mutante *hog1 sko1* como triángulos invertidos.

(I.D. se refiere a intestino delgado).

Para completar la caracterización fenotípica de los mutantes *sko1* y *hog1 sko1* en su capacidad de establecerse como parte de la microbiota intestinal de ratón se realizaron ensayos de sensibilidad/resistencia frente a sales biliares y distintas concentraciones de CO₂ y O₂ (imitando así los posibles ambientes de las diferentes porciones del intestino).

Observamos (Figura 34) que en presencia de 0.15 % de sales biliares solo la cepa parental y el mutante *sko1* son capaces de crecer; cuando incrementamos la concentración al 0.3 % solo el mutante sencillo *sko1* muestra crecimiento. Tal y como ya se había descrito (Prieto *et al.*, 2014), el mutante *hog1* es sensible a sales biliares y, como quizá cabría esperar, el doble mutante *hog1 sko1* también lo es. Los fenotipos se mantienen aunque

incubemos las cepas con distintas concentraciones de CO₂ y O₂ (creciendo algo peor el mutante *sko1* en 5 % de CO₂ y con 0.3 % de SB). Estos resultados se correlacionan con la capacidad de establecerse como comensal, ya que los mutantes carentes de *HOG1* son muy susceptibles a la presencia de sales biliares y son aquellos que muestran una mayor dificultad para la colonización del tracto gastrointestinal.

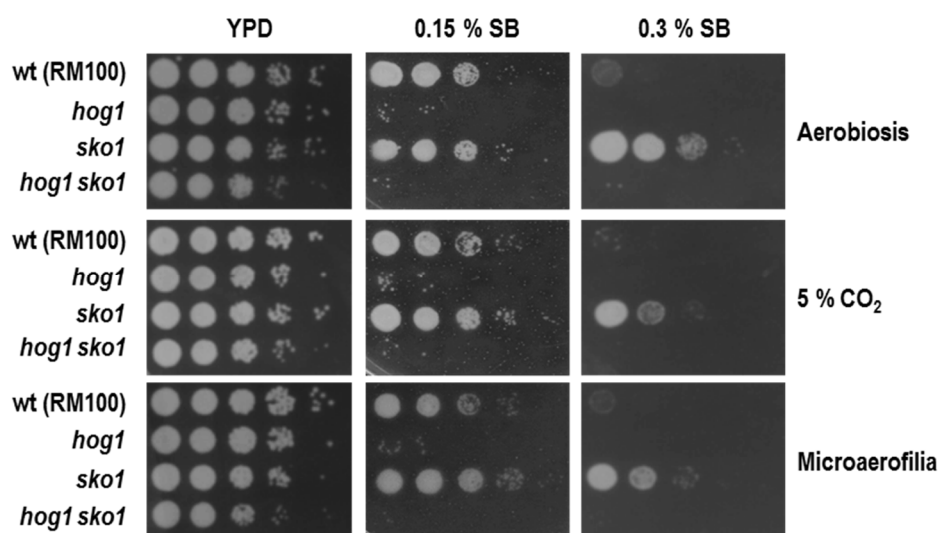


Figura 34. Crecimiento de los mutantes *SKO1* en presencia de sales biliares.

Siembra en gota de diluciones seriadas de cultivos en fase estacionaria en placas de YPD y YPD suplementadas con 0.15 y 0.3 % de sales biliares. Incubadas durante 24 horas a 37°C en distintas condiciones: aeróbicas, presencia de 5 % de CO₂ (incubación en estufa con 21 % de O₂ y 5 % de CO₂) y en microaerofilia (jarra de microaerofilia con sobre de Genbox micro). Transcurrido ese tiempo fueron escaneadas.

2. Búsqueda y caracterización de factores de transcripción implicados en respuesta a estrés

A. Identificación de mutantes en FTs sensibles a estrés

Como se ha descrito en la introducción en *Candida albicans* se han descrito factores de transcripción implicados en la respuesta a diferentes tipos de estrés entre los que podemos destacar Cap1 y Skn7 implicados en la respuesta a estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2004; Alarco and Raymond, 1999). Con el fin de identificar otros factores de transcripción (FTs) implicados en respuesta a estrés nos planteamos realizar un cribado de mutantes en FTs.

Se analizaron un total de 241 mutantes en factores de transcripción de una colección cedida por el Dr. Sanglard. Estos mutantes proceden de distintos fondos genéticos que fueron obtenidos mediante los métodos de transposición UAU (aproximadamente el 75 % de los mutantes) y el método del casete de interrupción *URA3* los restantes (Vandeputte *et al.*, 2012). El análisis planteado se llevó a cabo mediante un rastreo/búsqueda de aquellos mutantes que mostrasen fenotipos de sensibilidad/resistencia a distintos agentes generadores de estrés (osmótico y oxidativo), agentes que alteran la pared celular (rojo Congo) y a temperatura (42°C). Los ensayos se realizaron en placas de YPD suplementadas con los compuestos a ensayar como se describe en Materiales y Métodos (Figura 85). Se incluyó siempre la cepa parental de los mutantes a analizar así como el mutante *cap1* que es sensible a agentes oxidantes.

Tras realizar este primer análisis se procedió a verificar los resultados. Se incluyeron en este segundo análisis los distintos clones de los mutantes presentes en la colección que mostraron algún tipo de sensibilidad. En la Figura 35 se muestra un ejemplo de la comprobación de distintos clones de un mismo mutante (*skn7* y *rfg1*). Aquellos mutantes en los que los distintos clones dieron fenotipos distintos fueron eliminados del análisis (como es el caso del mutante *rfg1* mostrado en la Figura 35).

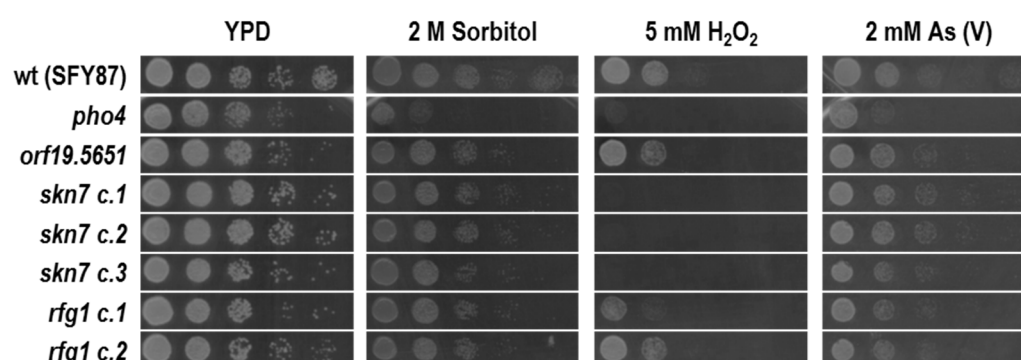


Figura 35. Ejemplo de comprobación de los distintos clones de un mismo mutante frente a estrés oxidativo.

Partiendo de cultivos en fase estacionaria se procedió a la siembra en gota de diluciones seriadas en placas de YPD y YPD suplementadas con 2 M de Sorbitol, 5 mM de peróxido de hidrógeno y 2 mM de arseniato sódico (As (V)). Tras incubarlas a 37°C durante 24 horas se escanearon.

Este cribado permitió la identificación de 11 mutantes que muestran fenotipos de sensibilidad a algún tipo de estrés analizado. De éstos, solo Cap1 y Skn7 habían sido anteriormente implicados en respuesta a estrés oxidativo y por tanto, ratifican la validez de nuestro ensayo. Hemos identificado además 9 nuevos mutantes en FTs con un papel relevante en la respuesta o adaptación a estrés.

Dichos mutantes, así como el grado de sensibilidad se detallan en la Tabla 4 que se encuentra a continuación.

	ESTRÉS OSMÓTICO		ESTRÉS OXIDATIVO			PARED CELULAR	OTROS	
	NaCl	Sorbitol	H ₂ O ₂	Diamida	Menadiona	Rojo Congo	Arseniato sódico	Temperatura
<i>pho4</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	=
<i>skn7</i>	=	=	+++	=	=	-	=	=
<i>upc2</i>	=	=	++	++	+	=	=	=
<i>glo3</i>	=	=	++	++	=	++	=	++
<i>zcf13</i>	=	=	++	++	=	++	=	++
<i>orf19.2260</i>	=	=	++	+++	+++	=	+++	=
<i>mig1</i>	=	=	=	++	+	+	=	=
<i>ada2</i>	=	=	+	+	+	=	++	=
<i>rlm1</i>	=	=	=	++	=	+++	=	=
<i>wor3</i>	=	=	+++	=	+++	+++	+++	+
<i>cap1</i>	=	=	+++	+++	+++	=	+++	=

Tabla 4. Mutantes en factores de transcripción que muestran fenotipos de sensibilidad frente a los agentes o condiciones ensayados.

Nota: +++ muy sensible, ++ sensible, + ligeramente sensible - resistente, = comportamiento similar a su cepa parental.

Resultados

De los 9 mutantes en FTs identificados, seleccionamos 4 para posteriores estudios por ser los que mostraban una mayor sensibilidad a estrés oxidativo. Los mutantes en FTs elegidos fueron: *orf19.2260*, *pho4*, *upc2* y *wor3* cuyas características descritas en la base de datos de *Candida* (CGD *Candida* Genome Database) son las siguientes:

- **orf19.2260:** posible factor de transcripción con un anillo de zinc como motivo de unión al DNA.
- **Pho4:** factor de transcripción tipo hélice-giro-hélice de la familia myc, necesario para el crecimiento en medio con bajo fosfato y para la resistencia a cobre y Floxina B, inducido por Mnl1 bajo estrés ácido.
- **Upc2:** factor de transcripción de tipo Zn(2)-Cys(6), regulador de genes implicados en la síntesis de ergosterol y de resistencia a azoles.
- **Wor3:** regulador del cambio blanca-opaca de las células; su delección estabiliza las células opacas a temperaturas altas e induce la formación de biopelículas en medio Spider.

Llevamos a cabo ensayos de sensibilidad en placa para la comprobación de los fenotipos de susceptibilidad de los cuatro mutantes en factores de transcripción elegidos. El mutante *pho4* es mucho más sensible a todos los compuestos ensayados que su cepa parental (SFY87) mientras que, por el contrario, el mutante *orf19.2260* es solamente sensible a compuestos generadores de estrés oxidativo. Por otro lado, el mutante *upc2* fue ligeramente más sensible que su cepa parental (DAY286) frente al estrés generado por agentes oxidantes, mientras que el mutante *wor3* presentó un comportamiento similar a *upc2*, mostrando sensibilidad a oxidantes pero también a rojo Congo (Figura 36).

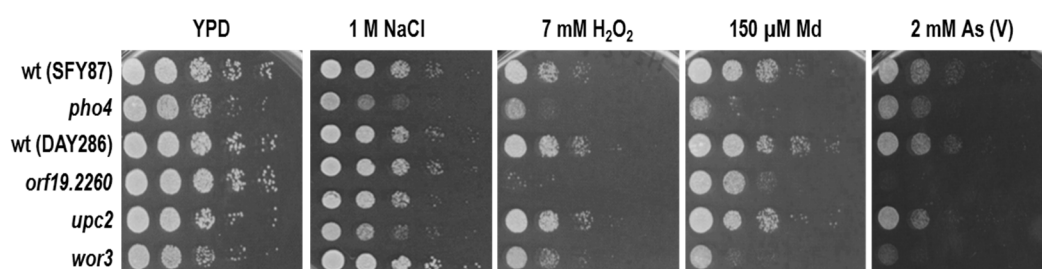


Figura 36. Sensibilidad en placa de los mutantes seleccionados a distintos compuestos generadores de estrés.

Siembra de diluciones seriadas en placas de YPD y YPD suplementadas con 1 M de NaCl, 7 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 150 μ M de menadiona (Md) y 2 mM de As (V). Se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se escanearon.

B. Ensayo de virulencia de los mutantes alterados en factores de transcripción en el modelo de *Galleria mellonella*

Para estudiar la virulencia *in vivo* de los factores de transcripción seleccionados empleamos el modelo de *Galleria mellonella*. Este modelo se utiliza para estudiar tanto la virulencia como la filamentación y la interacción con hemocitos de hongos patógenos (Fuchs *et al.*, 2010). El uso de larvas de *G. mellonella* muestra ciertas ventajas respecto al modelo tradicional de supervivencia en ratones (Brennan *et al.*, 2002). Algunas de estas ventajas son su fácil inoculación, no requerir de un equipamiento especial y el hecho de que puede utilizarse un mayor número de ejemplares y de réplicas de los experimentos por tener menor coste económico y no existir limitaciones bioéticas en su uso.

En este ensayo de virulencia se emplearon 20 larvas de *G. mellonella* en estadio cinco para cada una de las cepas a analizar. Las larvas fueron infectadas con dosis de 1×10^6 células y 5×10^5 células por larva. Posteriormente, se incubaron a 37°C en oscuridad y se siguió entre 7 y 9 días la supervivencia de las mismas. Como controles se usan larvas sin inocular (marcadas como Control en las gráficas) y larvas inoculadas con PBS (larvas Control PBS en las gráficas). Los datos se representaron mediante una curva Kaplan-Meier y se realizó el análisis estadístico Test Log-rank (Mantel-Cox).

Puesto que los mutantes proceden de distintos fondos genéticos se analizaron los datos obtenidos de las cepas parentales. A la vista de los resultados obtenidos es importante destacar que existen diferencias significativas entre las cepas parentales analizadas ($P = 0.0349$ para SFY87 vs DAY286 y $P = 0.0274$ para la comparación SFY87 y

Resultados

RM100). La cepa SFY87 es, pues, más virulenta que las otras dos (Figura 37.A) en este modelo.

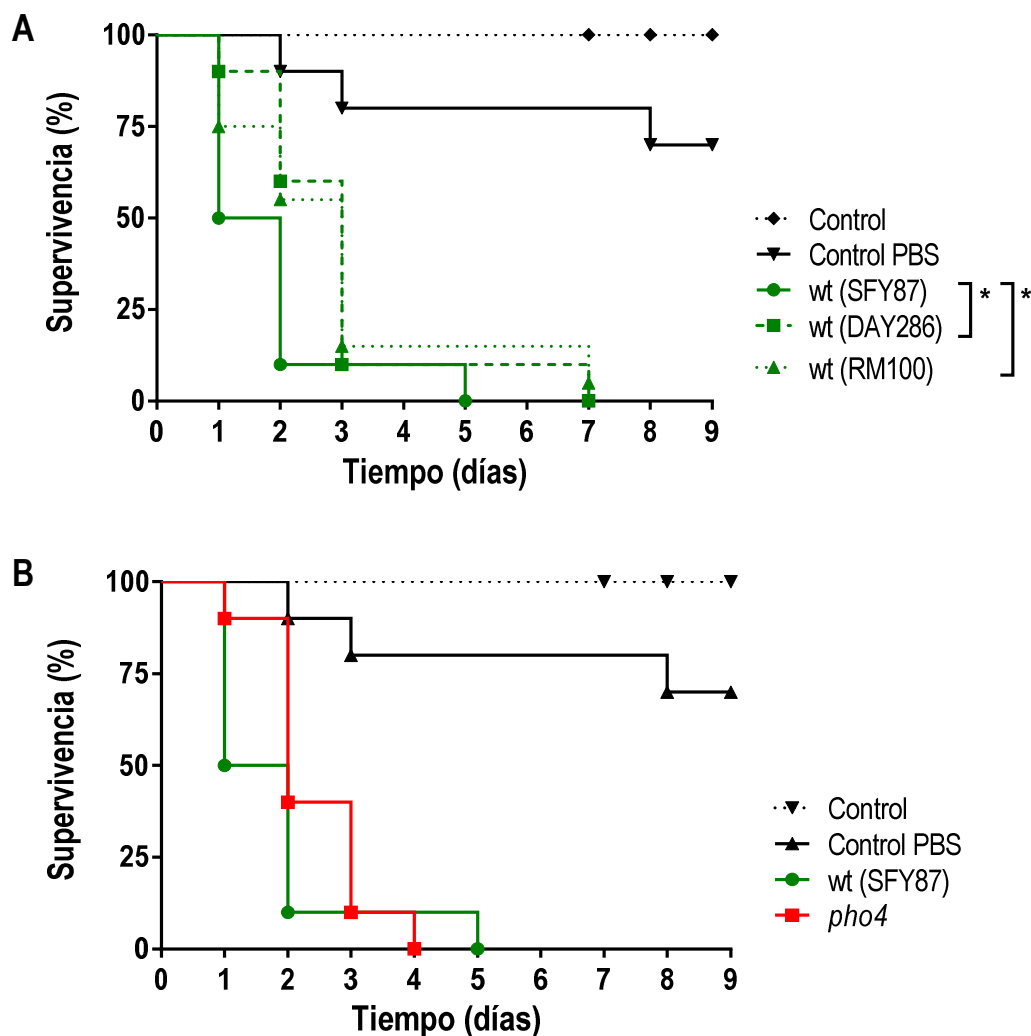


Figura 37. Supervivencia de diferentes cepas silvestres y el mutante *pho4* en el modelo de virulencia *Galleria mellonella*.

Larvas de *G. mellonella* fueron inoculadas mediante inyección en la pro-pata izquierda con 10^6 células de *Candida albicans*. Las larvas una vez inoculadas se incuban a 37°C a lo largo de 9 días de incubación. La gráfica (A) muestra las curvas de supervivencia de las cepas parentales (SFY87, DAY286 y RM100). (B) Curva de supervivencia del mutante *pho4* y su cepa parental. Los datos fueron analizados con un Test Log-Rank (Mantel-Cox).

Como se muestra en la Figura 37.B el comportamiento de los mutantes analizados fue similar, comportándose igual o parecido a la parental. Por un lado, el mutante *pho4* produce una tasa de mortalidad muy similar a la de su cepa parental, siendo la mortalidad de un 100 % entre el quinto y sexto día. Por otro lado, los mutantes *upc2* y *wor3* se comportan de manera similar a su cepa parental (DAY286), mientras que el mutante

orf19.2260 muestra un 30 % de supervivencia al final del experimento (Figura 38.A). Si comparamos la cepa SFY87 o el mutante *pho4* con el resto de cepas estudiadas, SFY87 y *pho4* son más virulentas debido al fondo genético.

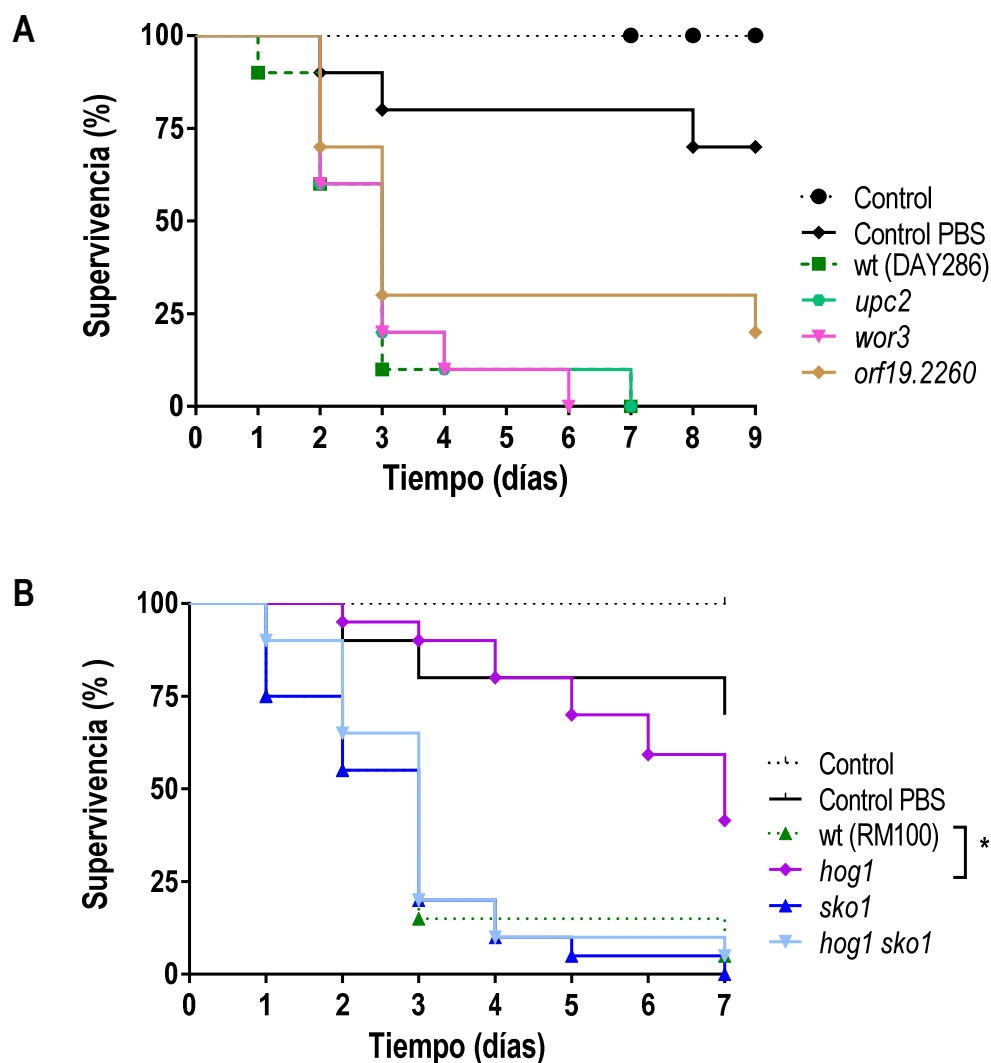


Figura 38. Supervivencia de distintos mutantes en el modelo de virulencia *Galleria mellonella*.

Curva de supervivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas mediante inyección de 10^6 células de *Candida albicans* en la pro-pata trasera izquierda. (A) Los mutantes *orf19.2260*, *upc2* y *wor3* junto con su cepa silvestre y en la gráfica (B) se representa la supervivencia de los mutantes *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1* con su cepa parental. Los datos fueron analizados con un Test Log-Rank (Mantel-Cox).

También analizamos la virulencia de los mutantes en el factor de transcripción Sko1 y la MAP quinasa Hog1 (Figura 38.B). Como puede observarse, el mutante *sko1* es igual de virulento que la cepa silvestre, mientras que el mutante *hog1* es prácticamente avirulento. Estos resultados corroborarían datos obtenidos en un modelo de infección sistémica en

ratón, ya que *sko1* se comporta como la cepa silvestre (Alonso-Monge *et al.*, 2010) y el mutante *hog1* es avirulento (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Es de destacar que el doble mutante *hog1 sko1* es virulento mostrando un fenotipo similar al mutante *sko1* y a la parental RM100.

Los datos obtenidos con la inoculación de una dosis de 5×10^5 células reflejaron un comportamiento cualitativamente similar de los mutantes, habiendo de media un 40 % de supervivencia al final del experimento (datos no mostrados). Estos resultados indican, por tanto, que la dosis del inóculo es un factor determinante en la realización de estos ensayos.

C. Ensayos de interacción de los mutantes en FTs con células del sistema inmunitario

La respuesta innata es esencial en el control de las infecciones causadas por *C. albicans*. En esta respuesta, juegan un papel esencial las células fagocitarias, tanto macrófagos como neutrófilos, a través de mecanismos oxidativos (generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) y no oxidativos (acción de distintas enzimas contenidas en los lisosomas). Dada la susceptibilidad de estos mutantes a agentes oxidantes en los ensayos de sensibilidad en placa, decidimos estudiar también su comportamiento *ex vivo* frente a células del sistema inmunitario.

Para ello se realizaron ensayos de viabilidad frente a dos tipos distintos de células. Por un lado se empleó la línea celular RAW264.7 (línea celular monocítica de origen murino cuyo comportamiento podemos asemejar a macrófagos) y por otro lado macrófagos residentes en el peritoneo de ratón. Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad de los distintos mutantes en FTs y sus correspondientes cepas parentales en presencia de ambos tipos de macrófagos. La cuantificación de la viabilidad se realizó tras 2 horas de co-cultivo con ambos tipos celulares en una relación de 1:40 (1 levadura por cada 40 RAW264.7/macrófagos peritoneales) incubándose a 37°C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

En el caso de la línea RAW264.7 se observó, en primer lugar diferencias significativas de comportamiento entre las cepas parentales estudiadas. Así, a las 2 horas de co-cultivo SFY87 mostró una viabilidad del 38 % frente al 76 % de la cepa parental DAY286. La comparación de cada factor de transcripción con su cepa parental correspondiente, mostró

que el mutante *pho4* posee una mayor capacidad de supervivencia frente a este tipo celular que la mostrada por la cepa parental. Por el contrario, los otros mutantes en factores de transcripción mostraron una mayor sensibilidad frente a este tipo de macrófagos, con tasas de supervivencia significativamente más bajas (Figura 39.A).

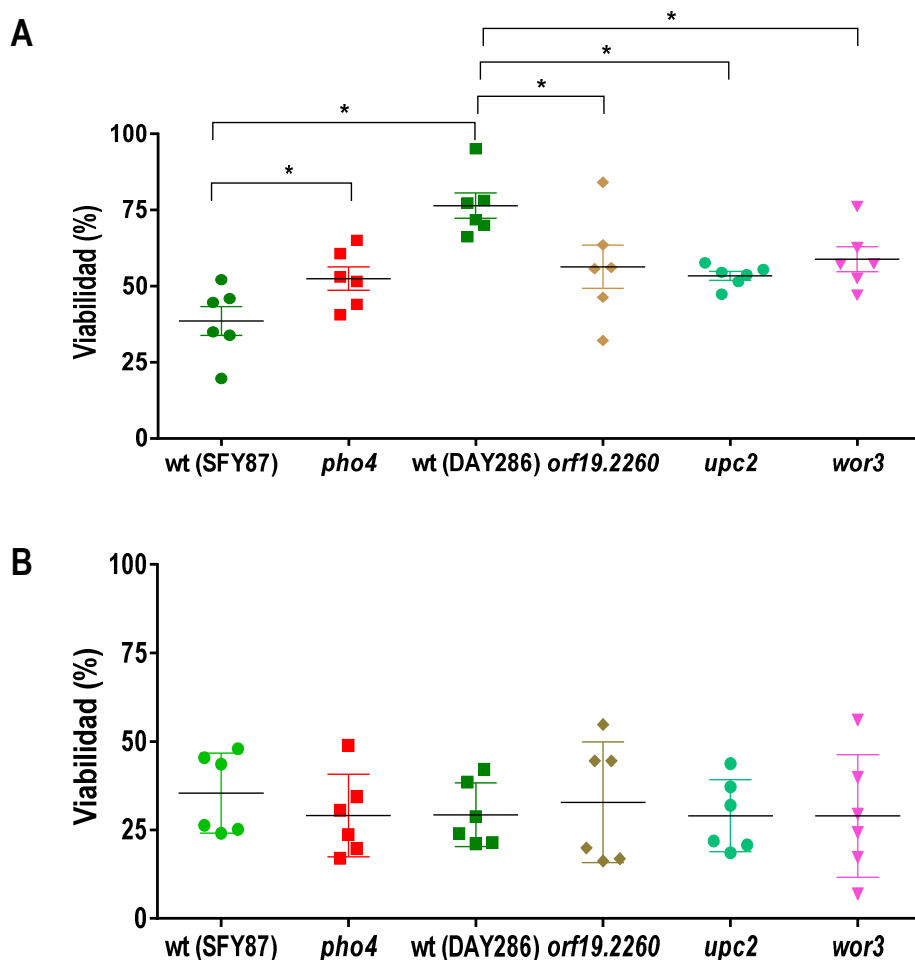


Figura 39. Viabilidad de los mutantes en factores de transcripción en presencia de fagocitos.

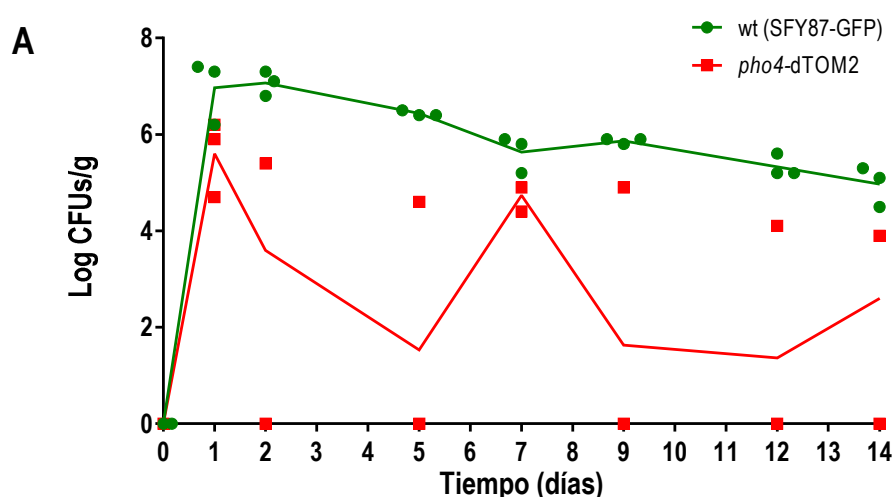
Porcentaje de viabilidad de los mutantes *pho4*, *orf19.2260*, *upc2* y *wor3* y sus cepas parentales en presencia de la línea celular murina de macrófagos RAW264.7 (A) y de macrófagos peritoneales de ratón.(B). Las células de levadura se incubaron con la línea celular o los macrófagos de ratón durante 2 horas con una relación de infección 1:40 (1 célula de levadura por cada 40 fagocitos) a 37°C y en una atmósfera con 5 % de CO₂. Pasado ese tiempo se lisan los fagocitos y se siembra en placas las células de *C. albicans* (véase más detallado en Materiales y Métodos) y tras una incubación de 24/48 horas se procedió al recuento de UFCs. (* = P < 0.05).

El comportamiento de los mutantes analizados frente a la línea celular primaria de macrófagos peritoneales de ratón fue distinta a la obtenida con la línea celular RAW 264.7 (Figura 39.B). La viabilidad media (tanto de los factores de transcripción como de las cepas

parentales) es del 30 %, un porcentaje bastante inferior (~60 %) al obtenido con los macrófagos RAW 264.7. Es de destacar que, al contrario de lo que sucede con la línea celular murina, el porcentaje de supervivencia de todas las cepas ensayadas es muy similar, mostrando que los macrófagos peritoneales de ratón poseen un mayor efecto anti-*Candida* que la línea murina RAW 264.7.

D. Estudios de comensalismo en un modelo murino de mutantes en los factores de transcripción seleccionados

Nos pareció interesante estudiar el comportamiento de los factores de transcripción elegidos en el modelo de colonización de ratón desarrollado en nuestro laboratorio. Para llevar a cabo este tipo de estudios se marcaron los mutantes en factores de transcripción con la proteína roja fluorescente dTOM2 (Prieto *et al.*, 2014) (*pho4*-dTOM2, *orf19.2260*-dTOM2, *upc2*-dTOM2 y *wor3*-dTOM2) y las cepas parentales SFY87 y DAY286 con la proteína fluorescente verde GFP. Tras tratar a los ratones con antibióticos durante cuatro días (véase más detallado en Materiales y Métodos), se les administró a través de una cánula intragástrica un único inóculo que contenía una mezcla de la cepa parental y el mutante a ensayar. Durante los quince días que duró el experimento se mantuvo el tratamiento antibiótico para así poder permitir la colonización y mantenimiento de la misma. El seguimiento de la colonización se realizó mediante el recuento de UFCs en heces.



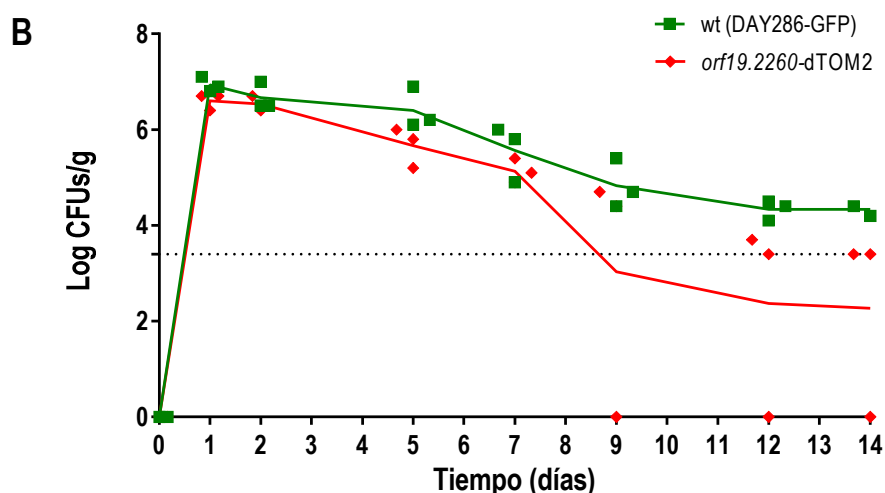


Figura 40. Niveles de colonización gastrointestinal de los mutantes *pho4* y *orf19.2260* en un modelo murino.

Representación de los valores medios de UFCs correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección (línea discontinua). Cada valor representa un animal.

Como podemos observar en la Figura 40 y Figura 41, todos los mutantes salvo el mutante *wor3*, son capaces de colonizar el intestino. En el caso del mutante *pho4* observamos que los niveles de colonización que alcanza tras la inoculación son más bajos que su cepa parental y que, con el paso de los días, éstos van disminuyendo hasta acabar por desaparecer (Figura 40.A). Por el contrario, tanto el mutante *orf19.2260* como el *upc2* son capaces de colonizar a niveles muy similares a los que muestra su cepa parental (Figura 40.B y Figura 41.A respectivamente). Ambos son capaces de mantener la colonización hasta el final del ensayo. En el caso del mutante *wor3* (Figura 41.B) no se detectó su presencia al día siguiente de la inoculación ni en los días posteriores por lo que se suspendió en el ensayo a día siete.

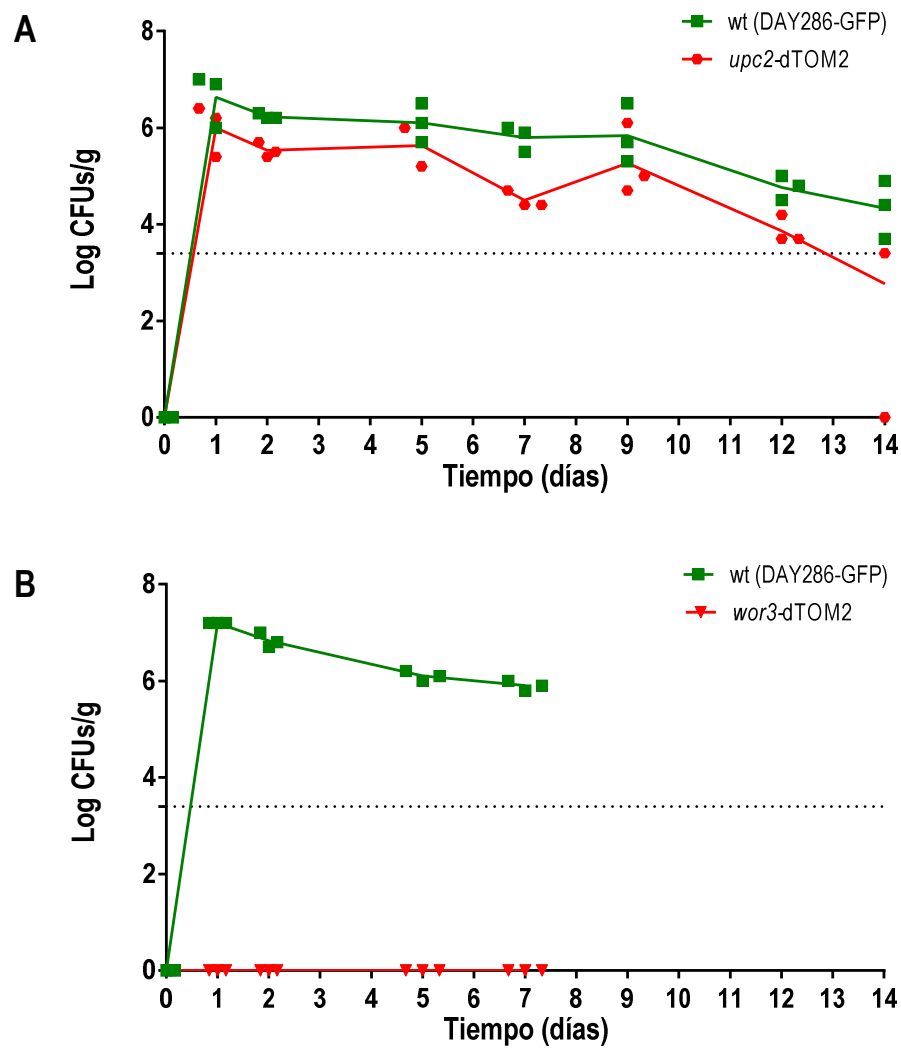


Figura 41. Niveles de colonización gastrointestinal de los mutantes *upc2* y *wor3* en un modelo murino.

Representación de los valores medios de UFCs de *C. albicans* en heces obtenidas a distintos tiempos de colonización en un grupo de ratones ($n = 3$) inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección (línea discontinua). Cada valor representa un animal.

3. Caracterización funcional del factor de transcripción Pho4 en *C. albicans*

Este bloque se centra en la caracterización funcional del gen *PHO4* de *C. albicans*, que codifica un factor de transcripción de tipo hélice-giro-hélice implicado en la respuesta a la depleción de fosfato (Homann *et al.*, 2009). Este gen fue identificado en el rastreo indicado anteriormente y su delección produce un defecto frente a diversos tipos de estrés. Con este fin se realizó un análisis bioinformático de la secuencia de Pho4, para analizar posteriormente su respuesta frente a estrés tanto osmótico como oxidativo y nitrosativo así como su capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de ratón.

A. Estudio bioinformático de Pho4

PHO4 tiene un tamaño de 1980 pb y codifica una proteína de 659 aminoácidos con un peso molecular de 71.5 kDa, mientras que su homólogo en *S. cerevisiae*, *ScPHO4* tiene un tamaño menor 940 pb y codifica una proteína de 312 aminoácidos y 34.1 kDa de peso molecular. Ambas proteínas poseen una identidad del 53 % (32 de los 60 aminoácidos) en el dominio de unión a DNA localizado en el extremo C-terminal, comprendido en *S. cerevisiae* entre los aminoácidos 247-312 y en *C. albicans* entre los aminoácidos 594 y 648 según la base de datos de motivos de proteínas PROSITE (Figura 42).

En *S. cerevisiae* se ha descrito que Pho4 es fosforilado por el complejo quinasa Pho80/Pho85 en cinco dipéptidos Ser-Pro localizados en las posiciones 100, 114, 128, 152 y 223 (O'Neill *et al.*, 1996; Kaffman *et al.*, 1994) (Figura 42). La fosforilación en los aminoácidos 114 y 128 promueve la exportación nuclear por su unión a Msn5, mientras que la del aminoácido 152 impide su importación al núcleo y la fosforilación en el aminoácido 223 bloquea la interacción de Pho4 con el factor de transcripción Pho2 (Komeili and O'Shea, 1999a). En el alineamiento realizado mediante ClustalW2 se observa que estos sitios de fosforilación no coinciden en el alineamiento con residuos similares en *C. albicans*. Sin embargo se pueden identificar hasta 8 péptidos Ser-Pro en *CaPHO4* potencialmente relevantes para la función y/o localización de esta proteína.



112

B. Papel del factor de transcripción Pho4 en respuesta a estrés

I. Estudio de la respuesta a estrés osmótico

a) El mutante *pho4* es sensible a estrés osmótico

Tras identificar que el mutante *pho4* es sensible a estrés tanto osmótico como oxidativo, quisimos profundizar más en su papel frente a este tipo de estrés. Para ello integramos una copia del ORF de *PHO4* fusionado a myc (para su posterior detección por inmunodetección) bajo el control del promotor Tet reprimible por tetraciclina. A continuación, llevamos a cabo ensayos de sensibilidad en placa por siembra en gota. Partiendo de cultivos en fase estacionaria se sembraron en forma de gotas diluciones seriadas desde 10^5 células en placas de YPD agar y placas de YPD agar suplementadas con 1 M de cloruro sódico.

Como se muestra en la Figura 43 el mutante *pho4* es mucho más sensible en las condiciones ensayadas (1 M de NaCl) en comparación con la cepa parental. La reintegración del gen *CaPHO4* revierte el fenotipo de sensibilidad del mutante siendo su comportamiento como el de la cepa parental.

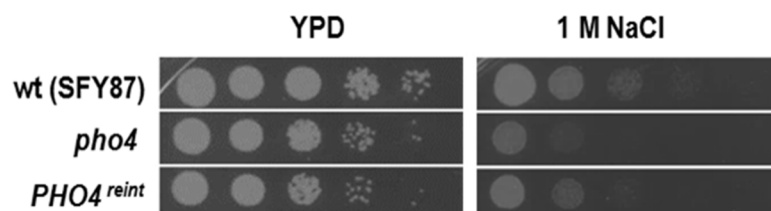


Figura 43. Sensibilidad a cloruro sódico del mutante *pho4*.

Partiendo de cultivos en fase estacionaria se sembraron diluciones seriadas de forma que cada gota contuviese desde 5×10^5 a 50 células en placas de medio rico YPD suplementadas con 1 M de NaCl, luego se incubaron a 37°C durante 24 horas para posteriormente ser escaneadas.

b) Los niveles de fosforilación de Hog1 dependen de los niveles de expresión de *PHO4*

Quisimos analizar el patrón de fosforilación de la MAP quinasa Hog1 en respuesta a estrés osmótico, ya que Hog1 se activa en presencia de dicho estrés. Con este objetivo realizamos una cinética de activación de las MAP quinasas en respuesta a un choque osmótico de 1.5 M de NaCl. Para ello, se diluyeron cultivos en fase estacionaria a D.O. = 0.1 en medio YPD fresco atemperado y se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron una D.O. = 1. Tras recoger la muestra sin estrés (correspondiente al tiempo 0) se adicionó 1.5 M de NaCl

Resultados

y se recogieron muestras a los 5, 15 y 30 minutos para su posterior tratamiento y análisis por inmunodetección (véase más detallado en Materiales y Métodos).

En la cepa parental Hog1 se fosforila tras 5 minutos de la adición del compuesto y esta fosforilación se mantiene hasta los 30 minutos (final del experimento). En el mutante *pho4* observamos una activación basal que se mantiene en el tiempo, observándose un ligero aumento en los niveles de fosforilación a los quince minutos (Figura 44). Por otro lado, en el reintegrante observamos que Hog1 se encuentra fosforilado basalmente y que los niveles de fosforilación aumentan tras la adición de NaCl, manteniéndose estables a lo largo del tiempo. El patrón de fosforilación de Mkc1 y Cek1 no muestra diferencias significativas entre los mutantes *pho4* y el reintegrante en comparación con la cepa parental.

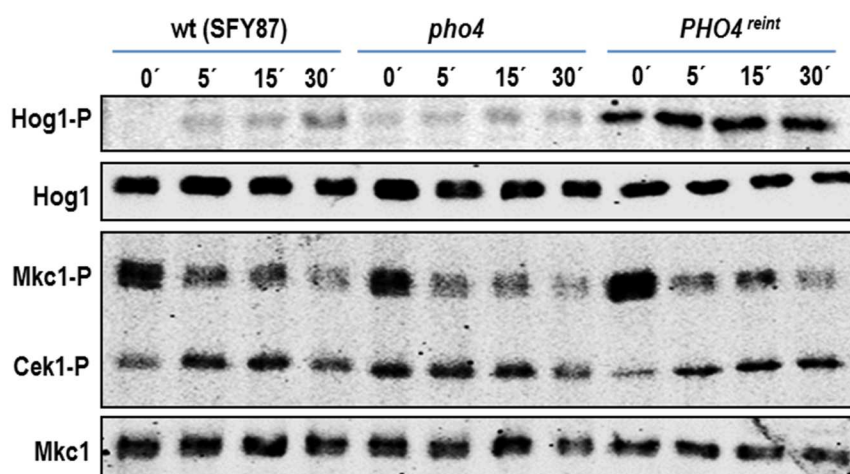


Figura 44. Cinética de activación de las MAP quinasas en presencia de NaCl en el mutante *pho4*.

Células en fase estacionaria de crecimiento de las cepas silvestre (SFY87), *pho4* y *PHO4^{reint}* fueron diluidas en medio fresco (YPD) a $A_{600} = 0.1$ e incubadas a 37°C hasta alcanzar una $A_{600} = 1$ momento en el cual fueron estresadas con NaCl a una concentración final 1.5 M. Las células fueron recogidas y procesadas adecuadamente para la detección de la fosforilación de Hog1 (P-p38 policlonal) y de Mkc1 y Cek1 (P-p44/42 monoclonal). Se analizó igualmente la cantidad de proteína Hog1 y Mkc1 como control de cantidad de proteína. La detección se llevó a cabo mediante fluorescencia.

La delección de *PHO4*, pues, afecta a la magnitud y patrón de activación de Hog1, lo cual podría explicar su fenotipo de osmosensibilidad. Los niveles de expresión de *PHO4* afectan a los niveles de fosforilación de Hog1 tanto basal como en respuesta a cloruro sódico, aunque no altera significativamente el patrón de fosforilación de Mkc1 y/o Cek1.

c) Pho4 se fosforila en presencia de cloruro sódico

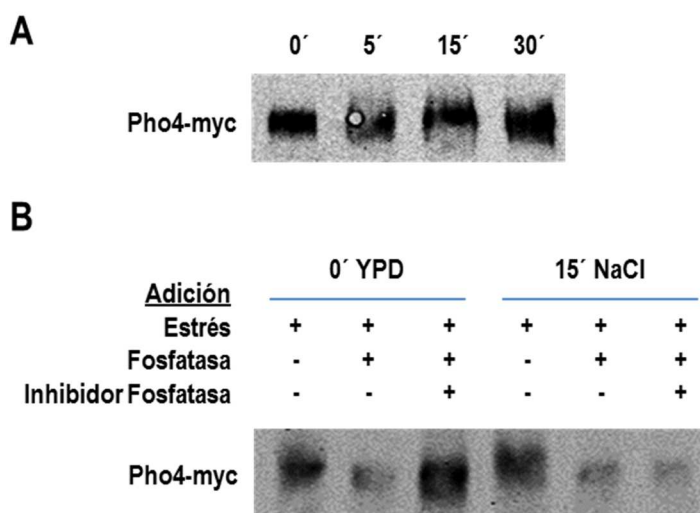
En *S. cerevisiae* Pho4 se fosforila en presencia fosfato (Kaffman *et al.*, 1994). Nosotros quisimos comprobar qué ocurría a Pho4 en respuesta a choque osmótico en *C. albicans* haciendo uso de la proteína de fusión Pho4-myc.

Como podemos observar en la Figura 45.A, a los quince minutos del tratamiento con 1.5 M de cloruro sódico podemos observar un retardo en gel respecto del resto de muestras. Este hecho parece indicar que Pho4 se fosforila en presencia de cloruro sódico. Para comprobar que realmente esta movilidad era debida a la fosforilación de la proteína inmunoprecipitamos las muestras y posteriormente las tratamos con fosfatasa alcalina y con un inhibidor de la fosfatasa alcalina (véase más detallado en Materiales y Métodos). En la Figura 45.B podemos observar como a tiempo 0 Pho4 se encuentra fosforilado, ya que cuando lo tratamos con fosfatasa alcalina vemos una leve disminución en el tamaño de la proteína. A los quince minutos de incubación en presencia de NaCl Pho4 parece estar fosforilado en más residuos que en estado basal. De igual forma el tratamiento con fosfatasa alcalina reduce el tamaño de la proteína. El inhibidor de la fosfatasa alcalina tuvo un efecto parcial y no se puede observar claramente como recupera la altura de la muestra sin tratar. Estos resultados nos permiten sugerir que en presencia de cloruro sódico Pho4 es fosforilado.

Figura 45. Movilidad de la proteína de fusión Pho4-myc en presencia de cloruro sódico.

A) Cinética en presencia de 1.5 M de cloruro sódico del mutante *PHO4^{reint}*, en el que se inmunodetecta la proteína de fusión Pho4-myc con el anticuerpo anti-myc.

B) Inmunodetección con anticuerpo anti-myc de la muestra sin tratamiento y con 15 minutos de tratamiento con 1.5 M de cloruro sódico tras su inmunoprecipitación y posterior tratamiento con fosfatasa alcalina e inhibidor de la fosfatasa alcalina.



II. Respuesta de Pho4 frente a estrés oxidativo

a) La delección de *PHO4* confiere sensibilidad frente a agentes oxidantes

En los ensayos de sensibilidad/resistencia del mutante *pho4* frente a agentes oxidantes se emplearon el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la menadiona (productora de radicales superóxido O_2^-). Estos ensayos se realizaron a partir de cultivos en fase estacionaria tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Como se puede apreciar en la Figura 46, el mutante *pho4* es ligeramente más sensible a H_2O_2 que la cepa parental. Por el contrario muestra un fenotipo de sensibilidad más acusado frente a menadiona donde apenas es capaz de crecer en las condiciones ensayadas. Al igual que en el caso del estrés osmótico, la cepa *PHO4^{reint}* es capaz de revertir los fenotipos de sensibilidad del mutante *pho4* creciendo a niveles similares a los de la cepa parental.

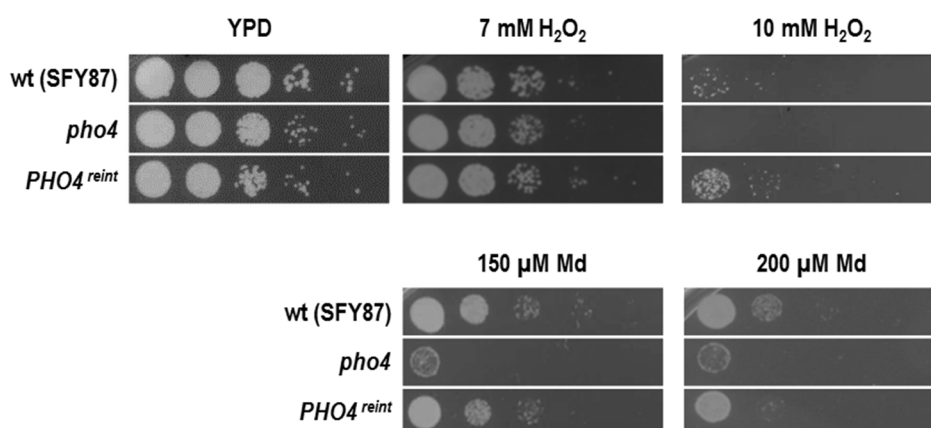


Figura 46. Crecimiento del mutante *pho4* en presencia de estrés oxidativo.

Diluciones seriadas de cultivos en fase estacionaria fueron sembradas en forma de gota de forma que cada gota contuviese desde 5×10^5 a 50 células en placas de medio rico YPD suplementadas o no con 7 y 10 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 150 y 200 μ M de menadiona (Md). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

b) La fosforilación de Hog1 es dependiente de Pho4 en respuesta a estrés oxidativo

Se analizó el patrón de activación de las MAP quinasas frente a estrés oxidativo. Para ello realizamos ensayos de cinética de activación de las MAP quinasas frente a ambos agentes oxidantes (10 mM de H_2O_2 y 150 μ M de menadiona), comparando en ellas la respuesta de la cepa parental con los mutante *pho4* y *PHO4^{reint}* (Figura 47).

En el caso de la activación de Hog1 puede apreciarse fosforilación en la cepa parental a los 5 minutos tras la adición de peróxido de hidrógeno (Figura 47.A), en un mutante *pho4* se observa la fosforilación basal de Hog1 y esta desaparece al añadir el agente oxidante. La cepa reintegrante presenta un nivel basal de fosforilación de Hog1 elevado, al igual que lo descrito en el apartado anterior, que aumenta tras añadir el peróxido de hidrógeno, manteniéndose esta fosforilación tras 30 minutos de incubación. En respuesta a menadiona (Figura 47.B) no se detectó fosforilación de Hog1 a las concentraciones y tiempo ensayados; sin embargo, se aprecia una clara activación en la cepa reintegrante, donde de nuevo Hog1 está activado basalmente y esta activación aumenta con la adición de 150 μ M de menadiona.

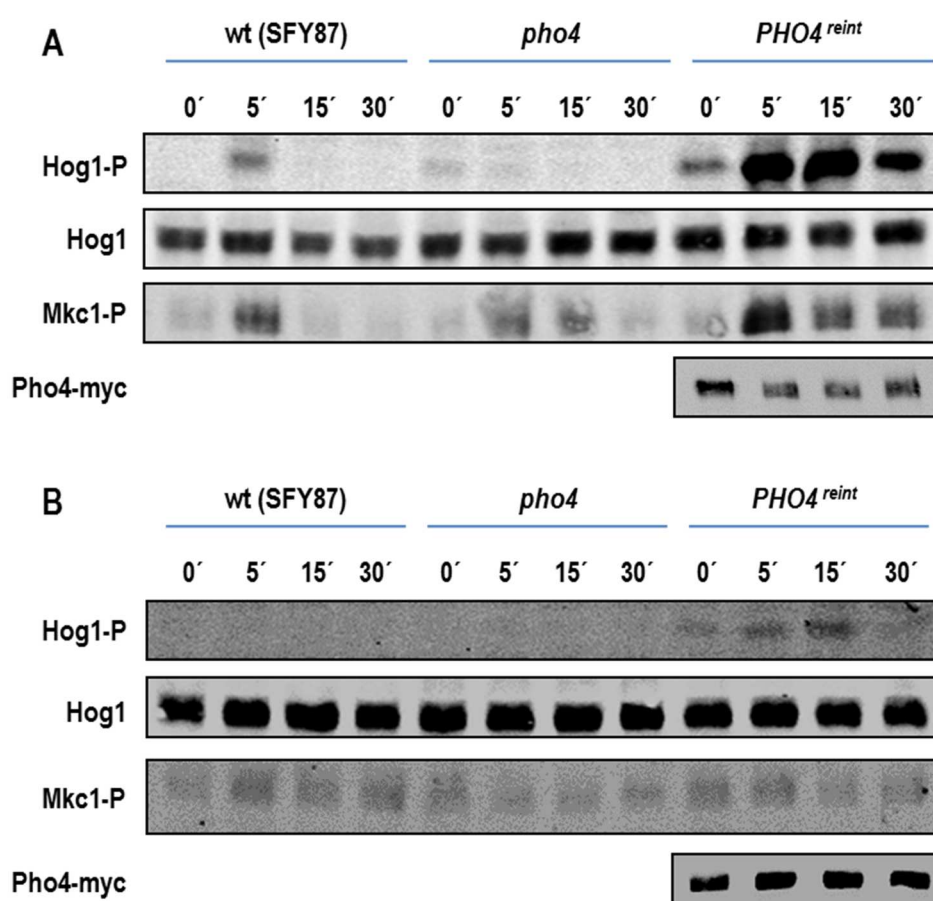


Figura 47. Cinética de activación por compuestos oxidantes en mutantes *pho4*.

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos a D.O. = 0.1 en medio fresco e incubado a 37°C hasta alcanzar una D.O. = 1, entonces se les somete a 10 mM de H₂O₂ (A) o 150 μ M de menadiona (B). Se recogieron las muestras a los tiempos indicados (minutos) y tras su procesamiento analizadas por inmunodetección para detectar los niveles de fosforilación de Hog1 (P-p38), y de Mkc1 (P-p44/42) y de la proteína de fusión Pho4-myc (anti-myc).

Es de destacar que al igual que ocurre en respuesta a estrés osmótico, los niveles de fosforilación de Hog1 son claramente superiores en la cepa *PHO4^{reint}*. En este caso, los niveles de fosforilación de Hog1 son muy superiores en presencia de peróxido de hidrógeno principalmente a los 5 y 15 minutos para disminuir a los 30 minutos, lo que indica que la cepa es todavía capaz de responder a peróxido de hidrógeno.

En el caso de Mkc1 observamos comportamientos diferentes en función del agente oxidante empleado. Cuando sometemos a las cepas en presencia de peróxido de hidrógeno (A) observamos que tanto en la cepa silvestre como en el mutante *pho4* se activa Mkc1 tras los primeros cinco minutos de exposición a este compuesto, y como los niveles de fosforilación se mantienen hasta los 15 minutos en el mutante *pho4*. En la cepa reintegrante observamos unos niveles de fosforilación de Mkc1 más altos y más duraderos en el tiempo. Por el contrario cuando sometemos a las cepas a menadiona (B), no se observa la fosforilación de Mkc1 en ninguna de ellas.

Analizamos también si al igual que ocurría con el estrés osmótico, Pho4 se fosforilaba en presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y la menadiona. Como queda reflejado en la Figura 47 no se detectó un retraso en la movilidad de la proteína a las concentraciones ensayadas ni en presencia de peróxido de hidrógeno (A) ni de menadiona (B). En presencia de peróxido de hidrógeno puede intuirse una disminución en el tamaño de la proteína. En presencia de menadiona fuimos incapaces de detectar cambios significativos en la movilidad electroforética de Pho4.

III. *pho4* es sensible al estrés nitrosativo generado por GSNO

La respuesta innata generada por macrófagos y neutrófilos implica la liberación de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno. A tenor de los resultados obtenidos en los ensayos *ex vivo* frente a células inmunitarias (en los cuales no veíamos diferencias en cuanto a la susceptibilidad del mutante *pho4* en comparación con la cepa parental) y tras el estudio de la respuesta de Pho4 frente a estrés oxidativo, decidimos también estudiar su respuesta frente al estrés nitrosativo.

Para estudiar esta respuesta empleamos S-nitrosoglutatión (GSNO) que actúa como generador de óxido nítrico (especie reactiva de nitrógeno). Decidimos realizar un ensayo de cinética de viabilidad mediante recuento por UFCs ya que el GSNO genera óxido nítrico de

manera espontánea y su duración en el medio es muy corta en el tiempo, por lo que no se pueden llevar a cabo los tradicionales ensayos de sensibilidad en placa.

En la Figura 48, puede observarse, como tras la adición de 0.6 mM de GSNO, desciende el recuento de UFCs en ambas cepas. En el caso de la cepa parental dicho descenso alcanza su punto máximo a las 2 h cuando la viabilidad se ha visto reducida en un 20 %. Transcurridas aproximadamente cuatro horas, el recuento de UFCs de la cepa parental muestra una recuperación e incluso casi duplicación en el número de UFCs respecto al tiempo de las dos horas. Este punto de inflexión que se observa en la cepa parental parece indicar que el GSNO ha dejado de generar óxido nítrico. Además, nos indica que la cepa parental ha sido capaz de detoxificar o adaptarse a la presencia óxido nítrico y por tanto ha comenzado a duplicarse.

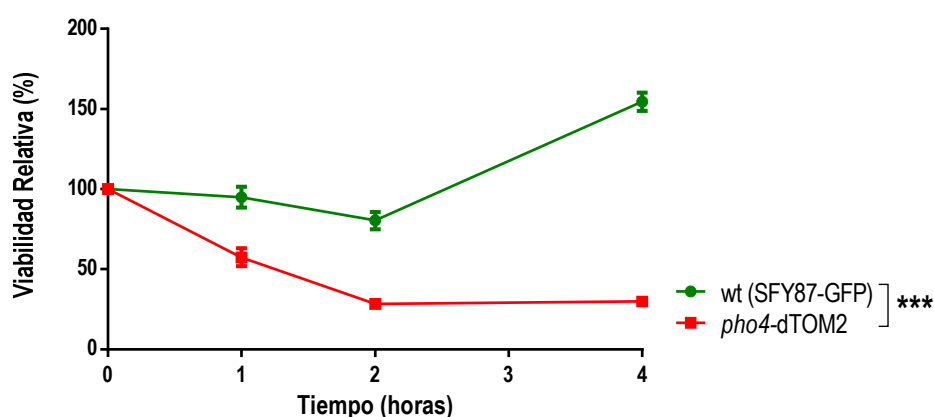


Figura 48. Cinética de viabilidad del mutante *pho4* frente a estrés nitrosativo.

En la gráfica se representa el porcentaje de viabilidad relativa de la cepa parental SFY87 y el mutante *pho4* respecto del tiempo cero de cada cepa. Células procedentes de cultivos en fase estacionaria fueron expuestas a 0.6 mM de GSNO e incubadas a 37°C durante 4 horas, en ese período de tiempo se recogieron muestras a distintos tiempos (0, 1, 2 y 4 horas) para finalmente determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El mutante *pho4* mostró una gran sensibilidad frente a este tipo de estrés. Como puede observarse en la Figura 48, existe un brusco descenso de la viabilidad del mutante *pho4* ya en la primera hora, punto en el que solo el 57 % de las células continúan vivas mientras que en la cepa parental es del 95 %. A las dos horas, al igual que ocurre con la cepa parental se produce el mayor descenso obteniéndose tan solo un 27 % de células viables en el mutante frente al 80 % de la cepa parental. El recuento de UFCs a las 4 h se mantiene en el mutante, lo que indica que las células no han sido capaces de adaptarse o

detoxificar el estrés generado por el GSNO al contrario de lo que sucede en la cepa silvestre. Estos datos indican que Pho4 media la respuesta a estrés nitrosativo en *C. albicans*.

C. Estudio de la relación entre Pho4 y el arsénico

El arsénico es un metaloide clasificado junto al nitrógeno, fósforo, antimonio y bismuto con los que comparte propiedades físico-químicas. Se encuentra ampliamente distribuido por la naturaleza incluyendo la corteza terrestre, suelos, agua y los seres vivos.

El arsénico es una de las diez sustancias químicas que la OMS considera más preocupantes para la salud pública. El arsénico inorgánico ha sido declarado como uno de los elementos más tóxico y con mayor riesgo para el ser humano de la naturaleza. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó al arsénico y los compuestos arsenicales como sustancias cancerígenas (Grupo I) para los seres humanos (IARC, 1987). La exposición prolongada al arsénico produce una enfermedad crónica denominada arsenicosis, bien sea por su ingesta (tanto en el agua de bebida como en alimentos) como por inhalación, lo que puede conllevar tanto a cáncer de piel, pulmón, hígado y vejiga (Tapio and Grosche, 2006) como a enfermedades cardiovasculares, digestivas y de la piel. En la naturaleza se puede encontrar en cuatro estados de oxidación: arseniato (As (V) +5), arsenito (As (III) +3), arsénico elemental o inorgánico (As 0) y el arseniuro o gas arsina (AsH₃ -3) (Rosen, 2002). Estos estados de oxidación son los que determinan el grado de toxicidad del arsénico siendo los estados más tóxicos el arsenito y el arseniato (Rosen and Liu, 2009).

I. La delección de *PHO4* confiere sensibilidad a arseniato (As (V))

El arsénico pentavalente o arseniato (As (V)) es un análogo estructural del fosfato (Figura 49), con constantes de disociación muy similares (pKa del ácido arsénico: 2.26, 6.76, y 11.3 mientras que el pKa del ácido fosfórico: 2.16, 7.21, and 12.3) (Villa-Bellosta and Sorribas, 2008). Esta analogía estructural hace que compita con el fosfato por la entrada en las células a través de los transportadores del fosfato (Huang and Lee, 1996).

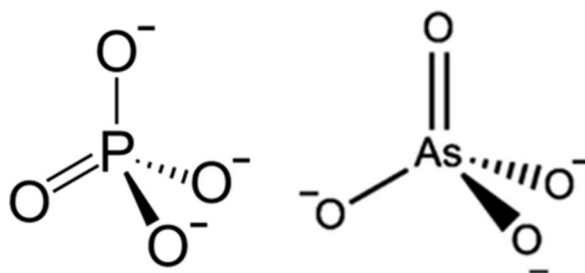


Figura 49. Estructuras moleculares del fosfato y el arseniato.

Una vez dentro de las células puede actuar como inhibidor en la formación de ATP o desacoplar la fosforilación oxidativa. Ello es debido a que el arseniato puede sustituir al fosfato en ciertas reacciones enzimáticas como en el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dando como resultado 1-arseno-3-fosfoglicerato (en lugar de 1,3-bifosfoglicerato) que es muy inestable y se hidroliza rápidamente, por lo que no se produce la síntesis final de ATP de la glucólisis. También desacopla la fosforilación oxidativa ya que al sustituir al fosfato puede llegar a formar ADP arseniato en lugar de ATP.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que el arseniato podría entrar en la célula a través de los transportadores de fosfato de alta afinidad (Pho84 y Pho89 cuya expresión es dependiente del factor de transcripción Pho4) o bien de baja afinidad (Pho87 y Pho90) (revisado por (Wysocki and Tamas, 2010)). Una vez dentro de la célula es reducido por arseniato reductasas concretamente Acr2 a arsenito (As (III)), usando para ello el potencial redox del glutatión, y así bien ser exportado por la proteína de membrana Acr3 o acumulado en vacuolas gracias a Ycf1 (Menezes *et al.*, 2008).

Dada la homología estructural entre el fosfato y el arseniato lo primero que nos planteamos es si Pho4 podría tener un papel en la respuesta de *C. albicans* frente a arseniato, para lo cual se realizaron ensayos de susceptibilidad frente a este compuesto. El resultado de dicho ensayo muestra que el mutante *pho4* es más sensible a la presencia de este compuesto que la cepa parental a las dos concentraciones ensayadas. La reintegración de la copia ectópica de *PHO4* revierte dicho fenotipo (Figura 50). Por lo tanto, la delección de *PHO4* afecta a la capacidad de resistencia frente a arseniato posiblemente por defectos relacionados con la detoxificación.

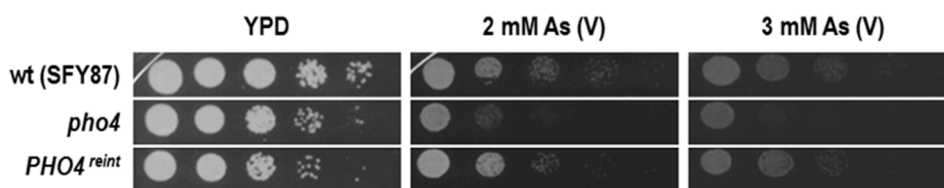


Figura 50. Susceptibilidad del mutante *pho4* a arseniato sódico (As (V)).

Partiendo de cultivos en fase estacionaria de crecimiento de las cepas de *C. albicans*, se sembró un número de células desde 5×10^5 a 50 en placas de medio rico YPD suplementadas con arseniato sódico (As (V)) a concentraciones de 2 mM y 3 mM. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se escanearon.

II. Respuesta de *C. albicans* a arseniato As (V)

a) El arseniato induce la fosforilación de Hog1 y Mkc1

En *S. cerevisiae* la ruta de integridad celular mediada por Slt2 es la que se encarga de percibir y mediar la respuesta a arseniato, aunque Rlm1 (el factor de transcripción dependiente de Slt2 en respuesta a daño en pared), no es esencial para dicha respuesta (Matia-Gonzalez and Rodriguez-Gabriel, 2011).

Para analizar el comportamiento de *C. albicans* en respuesta a arseniato y si alguna de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs está implicada en su señalización al igual que ocurre en *S. cerevisiae* analizamos el patrón de activación de dichas MAP quinasas. El ensayo consistió en una cinética en respuesta a 2 mM de As (V) de tres cepas parentales (SFY87, RM100 y CAF2), lo que nos permitiría comprobar si existen diferencias entre los fondos genéticos.

En presencia de arseniato sódico, se produce la fosforilación de Hog1 a los 5 minutos y se mantiene a lo largo del experimento. Se observan diferencias entre las cepas parentales analizadas en cuanto a los niveles de activación de Hog1 siendo menores en la cepa parental CAF2 e iguales en las otras dos cepas (SFY87 y RM100) (Figura 51).

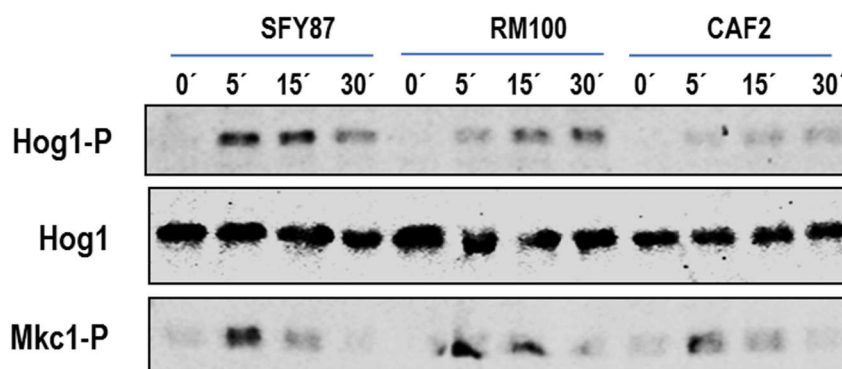


Figura 51. Cinética de activación de MAP quinasas en distintos fondos genéticos.

Patrón de fosforilación de las MAP quinasas frente a 2 mM de arseniato sódico (As (V)) en las cepas SFY87, RM100 y CAF2. Las muestras proceden de cultivos en fase exponencial y recogidas tras 5, 15 y 30 minutos de la adición del As (V). Posteriormente fueron procesadas y analizadas por inmunodetección para detectar la fosforilación de Hog1 y Mkc1, como control de carga se usó un anticuerpo anti-Hog1 que detecta la proteína total.

También se produce la activación de Mkc1 a los 5 minutos pero la duración de la fosforilación es menor en el tiempo (15 minutos) que la que se produce en Hog1. No se observaron diferencias entre los niveles de fosforilación de Mkc1 entre las distintas cepas.

b) La fosforilación de Hog1 es dependiente de Ssk1 en presencia de arseniato

Con intención de determinar si la respuesta a arseniato era mediada a través de Ssk1, como sucede en presencia de estrés oxidativo (Chauhan *et al.*, 2003), se analizó el patrón de fosforilación de las MAP quinasas tanto en la cepa parental CAF2 como en el mutante *ssk1* en presencia de 2 mM de As (V).

Como hemos podido comprobar anteriormente en la Figura 51 el arseniato (As (V)) fosforila Hog1, sin embargo, esta activación se bloquea en el mutante *ssk1* (Figura 52). En el mutante *ssk1*, los niveles de fosforilación de Mkc1 fueron sensiblemente menores que los observados en una cepa silvestre. Este patrón coincide con el que presentan los mutantes *pbs2* y *hog1* en respuesta a peróxido de hidrógeno (Arana *et al.*, 2005; Navarro-García *et al.*, 2005) pues, la ausencia de estos elementos de la ruta HOG disminuye la fosforilación de Mkc1 en respuesta a H₂O₂. Tal y como se aprecia en la figura este comportamiento también se produce en respuesta a arseniato. Observamos además una mayor activación basal de Cek1 en el mutante *ssk1* para decaer con el tiempo en presencia de arseniato.

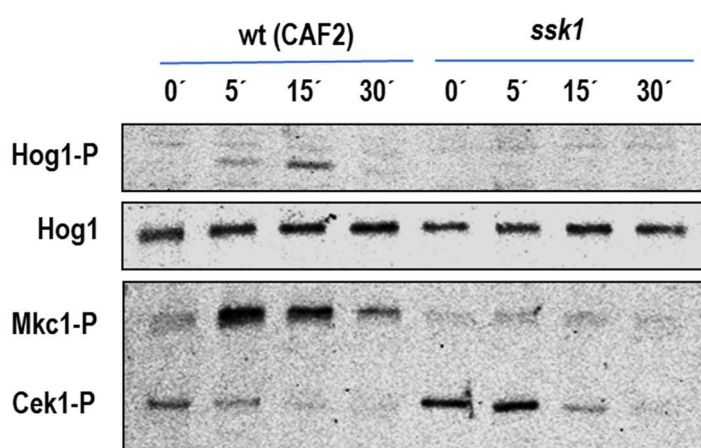


Figura 52. Patrón de fosforilación de Hog1 y Mkc1 en presencia de As (V).

Se diluyeron cultivos en fase estacionaria en medio rico YPD previamente atemperado a una D.O. = 0.1 y se incubaron nuevamente a 37°C. Cuando se alcanzó una D.O. = 1 se recogió la muestra correspondiente al tiempo 0 y se adicionó 2 mM de arseniato sódico a los cultivos para recoger muestras a los 5, 15 y 30 minutos de exposición al compuesto. Posteriormente se procesaron y analizaron por *western-blot*, detectando las formas fosforiladas de Hog1-P, Mkc1-P y Cek1-P, como control de carga de proteínas se usó Anti-Hog1.

c) Las rutas mediadas por Hog1 y Mkc1 no afectan a la susceptibilidad a arseniato en placa

Puesto que en *C. albicans* tanto Hog1 como Mkc1 se fosforilan en respuesta a arseniato se analizaron mutantes en ambas rutas por ensayos de sensibilidad en placa frente a arseniato. Se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de YPD agar suplementadas con 3 mM de As (V). También, se empleó sorbitol como osmoestabilizante para mutantes alterados en la integridad de la pared celular.

Los mutantes ensayados de la ruta HOG así como aquellos pertenecientes a la ruta de integridad celular no muestran una mayor susceptibilidad a arseniato sódico (Figura 53). Es destacable la sensibilidad mostrada por la cepa parental RM100 frente al crecimiento que presenta la cepa parental CAF2 o PVY121. Esta sensibilidad es revertida cuando la cepa crece en presencia de arseniato junto con sorbitol 1 M. Curiosamente, el mutante *hog1* y en menor medida el *hog1 mkc1*, derivados de la cepa RM100, son más resistentes que su cepa parental en placas de YPD suplementadas con arseniato sódico.

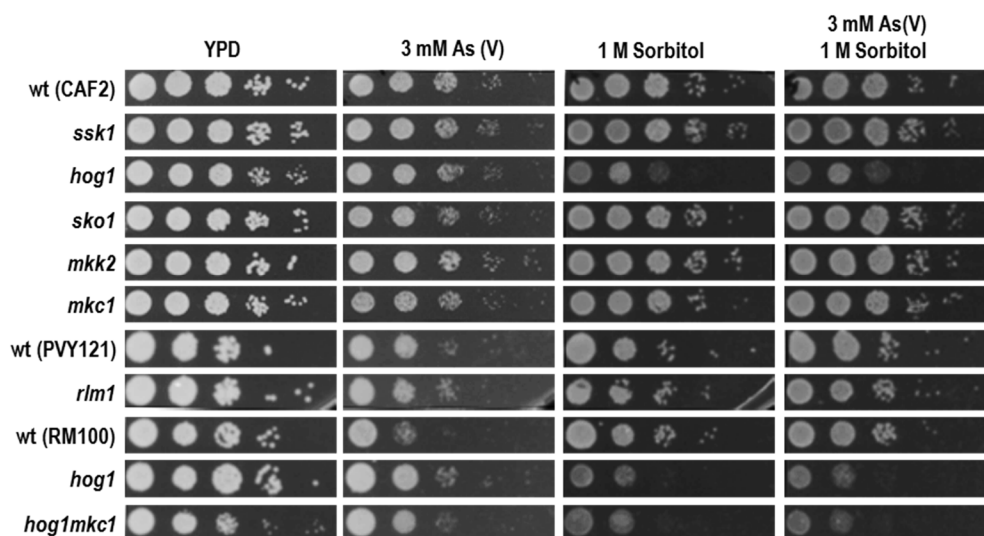


Figura 53. Elementos de la ruta HOG y de la ruta PKC en respuesta a As (V).

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos de forma seriada y sembrados en forma de gota en placas con YPD agar suplementadas con 3 mM de As (V), 1 M de sorbitol y 3 mM de As (V) + 1 M de sorbitol. Tras incubarse a 37°C durante 24 horas fueron escaneadas.

En el ensayo se incluyeron además mutantes defectivos en los factores de transcripción Sko1 (FT de la ruta mediada por Hog1) y Rlm1 (FT de la ruta de integridad celular). En ningún caso se detectó un aumento significativo de la sensibilidad a arseniato. Estos resultados indican que la respuesta a arseniato es dependiente de las rutas mediadas por Mkc1 y Hog1, aunque los mutantes en algunos de sus elementos no presenten un aumento de sensibilidad a este compuesto.

d) *C. albicans* es capaz de señalar de manera distinta el fosfato y el arseniato

Puesto que el arseniato es un análogo estructural del fosfato, nos preguntamos si *C. albicans* es capaz de diferenciar uno de otro.

Para ello analizamos el patrón de fosforilación de las MAP quinasas en respuesta a fosfato y arseniato de una cepa silvestre (CAF2) crecida en SD (alto fosfato). Cuando el cultivo hubo alcanzado una D.O. = 1, se recogió la muestra de tiempo 0, se separó el cultivo en dos y se adicionó la misma concentración (2 mM) de fosfato y de arseniato sódico. Tras recoger las muestras a los 5, 15 y 30 minutos, se procesaron las muestras y se analizaron por inmunodetección (*western-blot*).

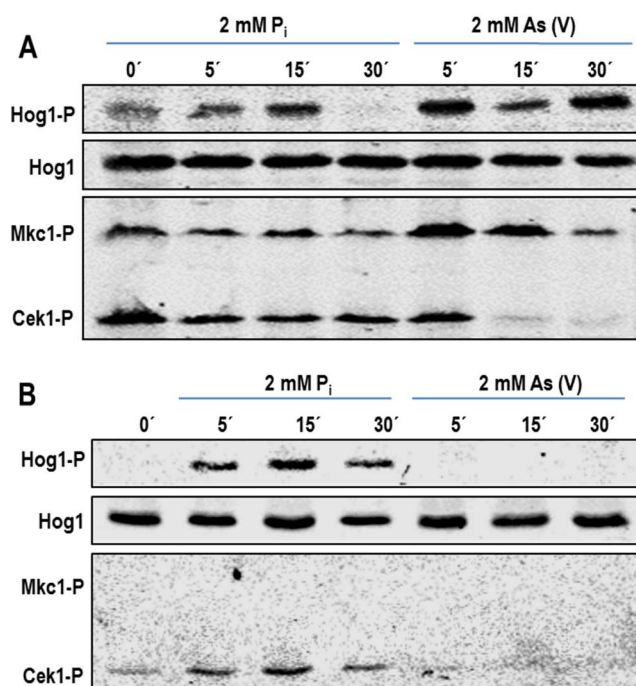
Resultados

Es de destacar el hecho de que Hog1 se activa en respuesta a ambos compuestos, siendo dicha activación más ligera y tardía en respuesta a fosfato (Figura 54.A). Mkc1 también se activa en respuesta a arseniato (detectable a los cinco minutos) que decae pasados los quince minutos, mientras que no existe un aumento en los niveles de fosforilación de dicha MAP quinasa en respuesta a fosfato. En presencia de fosfato se mantiene activada Cek1, pero en presencia de arseniato los niveles de fosforilación descienden tras cinco minutos de exposición.

Dado que existe una diferencia en el patrón de fosforilación de las MAP quinasas en respuesta a arseniato o fosfato, nos preguntamos si estas diferencias podrían deberse a la presencia inicial de fosfato en el medio de cultivo habitual. Para ello se realizó un ensayo partiendo de un cultivo mantenido en SD sin fosfato, y por tanto donde las reservas de fosfato inorgánico han sido consumidas, al que se le adicionó o bien 2 mM de fosfato inorgánico o 2 mM de arseniato sódico.

Figura 54. Niveles de fosforilación de las MAP quinasas en función de la presencia/ausencia de fosfato en el medio.

Cinética de fosforilación de las MAP quinasas en presencia de 2 mM de fosfato inorgánico o 2 mM de As (V). Para ello se parte de cultivos en SD con fosfato (A) o cultivos en SD sin fosfato (B), tras recoger la muestra control se adicionan los compuestos y se recogen muestras a los tiempos indicados en la figura. Se procesan y analiza el patrón de las MAP quinasas por inmunodetección.



En la Figura 54.B comprobamos que existe un incremento de la fosforilación tanto de Hog1 como de Cek1 cuando le adicionamos fosfato, mientras que si añadimos arseniato la fosforilación de estas se ve bloqueada. Es de destacar en este ensayo que el arseniato no es percibido o sentido en estas condiciones, es decir, no se produce la activación de ninguna MAP quinasa en presencia de arseniato cuando la levadura se encuentra en un medio sin fosfato.

Estos datos sugieren que *C. albicans* es capaz de percibir la presencia de fosfato y que la señalización en respuesta a arseniato es distinta en función de la presencia o no de fosfato en el medio.

e) Los niveles de expresión de *PHO4* aumentan en presencia a As (V)

Para poder evaluar el efecto de la presencia de fosfato y arseniato, cuantificamos la expresión de *PHO4* en respuesta a estos compuestos. Para llevar a cabo estos análisis utilizamos una construcción génica en la que el promotor de *PHO4* regula la expresión del gen de la luciferasa *CbLUC* integrado en una cepa silvestre. Crecimos dicha cepa en medio SD bajo fosfato al que adicionamos una concentración conocida de fosfato (2 mM de fosfato inorgánico); cuando estaba en fase exponencial se lavó dos veces con medio SD bajo fosfato para eliminar los restos del fosfato adicionado inicialmente. Tras ello se puso de nuevo a incubar a 37°C en medio SD bajo fosfato y en medio SD bajo fosfato suplementado con 2 mM de fosfato inorgánico (Pi), 2 mM de arseniato sódico (As (V)) y 2 mM de Pi más 2 mM de As (V), recogiendo muestras a los 15, 30 y 60 minutos para cuantificar la expresión de *PHO4* en el tiempo.

La expresión de *PHO4* se mantiene casi inalterable tanto en un medio con bajo fosfato como en un medio suplementado con 2 mM de Pi, por lo menos a los tiempos y en las condiciones ensayadas (Figura 55). Sin embargo, sí que existe un aumento de la expresión de *PHO4* a los quince minutos cuando se adiciona al medio el arseniato y es distinta dependiendo de la presencia o ausencia de fosfato. Al adicionar fosfato y arseniato en cantidades equimoleculares, el incremento es de 0.5 veces sobre el basal mientras que cuando solo hay arseniato en el medio los niveles de *PHO4* solo aumentan 2.5 veces. Transcurridos los primeros quince minutos los niveles en la expresión de *PHO4* en presencia de fosfato y arseniato vuelven a caer alcanzando los mismos niveles que aquellos medios que presentan fosfato (tanto en baja como en alta concentración), mientras que en el caso del arseniato los niveles caen más lentamente (manteniéndose por encima de dos veces respecto al valor basal).

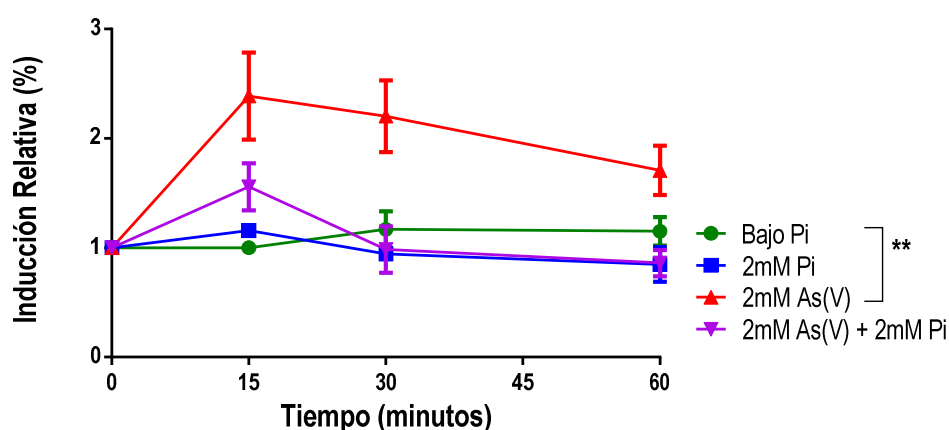


Figura 55. Inducción de *PHO4^{pr}-CbLUC* en presencia de arseniato y fosfato.

Partiendo de un cultivo en fase exponencial y creciendo en medio SD con bajo fosfato suplementado con 2 mM de Pi, se realiza una cinética para medir la expresión de *PHO4^{pr}-CbLUC* en una cepa silvestre (CAF2). Se lava dos veces con medio SD con bajo fosfato el cultivo y se resuspende de nuevo en medio SD con bajo fosfato que se suplementa con 2 mM de Pi, 2 mM de As (V) y 2 mM de Pi + 2 mM de As (V). Transcurridos los tiempos indicados en la figura se recogen las muestras y se procesan para su medición en el luminómetro (véase más detallado en Materiales y Métodos).

III. Relación entre Pho4 y Hog1 en respuesta a arseniato

Nos planteamos analizar cómo influía la presencia o no de este factor de transcripción en el patrón de fosforilación de las MAP quinasas. Para ello realizamos una cinética de activación en presencia de 2 mM de arseniato sódico de las cepas SFY87, el mutante *pho4* y el reintegrante *PHO4^{reint}*.

Los ensayos mostraron que en presencia de As (V) se produce tanto una activación de Hog1 como de Mkc1 a los cinco minutos de haber añadido el compuesto en todas las cepas (Figura 56). La fosforilación de Hog1 es más larga en el tiempo (llegando a los 30 minutos) tanto en un mutante *pho4* como en el reintegrante, mientras que en la cepa parental se detecta una disminución de la fosforilación de Hog1 a los 30 minutos. También podemos comprobar que, al igual que sucede con el estrés osmótico y oxidativo los niveles de fosforilación de Hog1 en el reintegrante son más altos que en la cepa silvestre o el mutante.

Por otro lado, la fosforilación de Mkc1 es más larga en el tiempo en la cepa silvestre si la comparamos con los mutantes. En la cepa silvestre la fosforilación se mantiene durante todo el experimento, mientras que en el mutante *pho4* los niveles bajan a los 30 minutos y

en el reintegrante se detecta un incremento de la fosforilación a los 5 minutos que después decae transcurridos 15 minutos.

Al mismo tiempo analizamos si la presencia de arseniato y fosfato en el medio hace que Pho4 se encuentre fosforilado o no. Podemos observar un cambio de movilidad (*shift*) tras los primeros cinco minutos de tratamiento con As (V) y en presencia de fosfato, lo que sugiere un aumento del peso molecular de la proteína probablemente debido a la fosforilación de la misma (Figura 56.B).

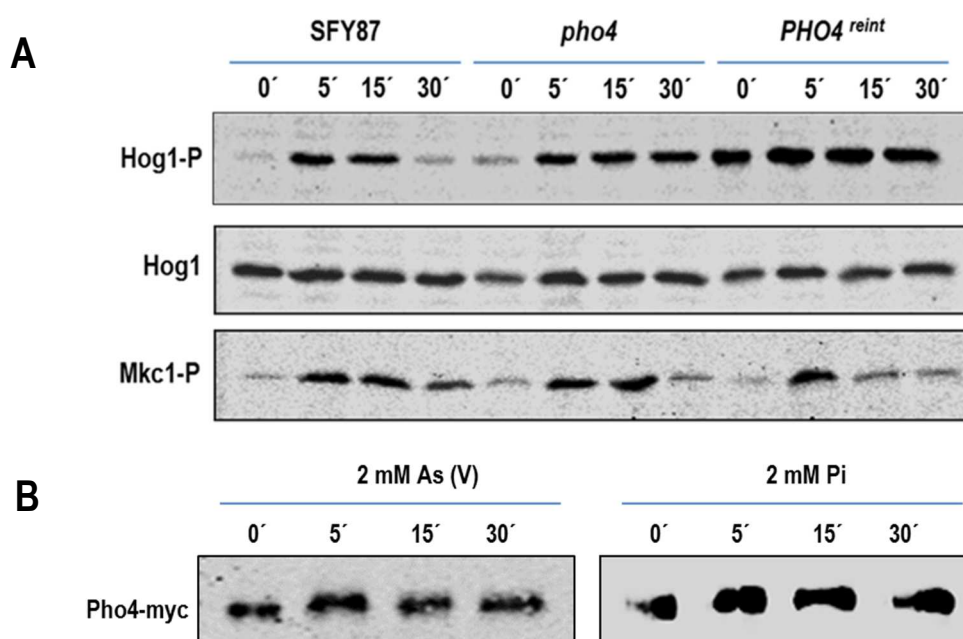


Figura 56. La cinética de activación de MAPKs frente a arseniato sódico y movilidad electroforética de Pho4-myc.

(A) Cultivos en fase exponencial (D.O. = 1) se expusieron a 2 mM de arseniato sódico durante 30 minutos. Se recogieron muestras a tiempo 0, 5, 15 y 30 minutos, se procesaron y analizaron mediante *western-blot* para la detección de la fosforilación de Hog1 (Hog1-P) y Mkc1 (Mkc1-P). Como control de carga se incubaron las muestras con el anticuerpo que reconoce la proteína Hog1 total. (B) Para la movilidad electroforética de Pho4-myc en presencia de fosfato, se partió de cultivos en fase exponencial crecidos en medio SD con bajo fosfato se incubaron en medio SD con 2 mM de Pi durante 30 minutos.

C. albicans es capaz de responder de forma distinta frente al arseniato y al fosfato y los niveles de expresión de *PHO4* aumentan en presencia de arseniato por ello nos preguntamos si los niveles de expresión de *PHO4* dependen de Hog1 en respuesta a arseniato. Para poder analizar dicha relación integramos la construcción que porta la región promotora del gen *PHO4* fusionada al gen de la luciferasa (*CbLUC*) en un mutante *hog1*.

Resultados

La cuantificación del nivel de expresión del promotor de *PHO4* la llevamos a cabo mediante una cinética en la que expusimos tanto la cepa silvestre (CAF2) como el mutante *hog1* crecidos en YPD a 2 mM de As (V). Los resultados de dicha cuantificación se muestran en la Figura 57. Observamos una inducción significativa de la expresión de *PHO4* tras los primeros 15 minutos de exposición al As (V) tanto en la cepa silvestre como en el mutante. Tras este periodo de tiempo la expresión decae hasta volver a los niveles basales. Si comparamos las curvas generadas por ambas cepas comprobamos que siguen una tendencia muy parecida, por lo que podemos concluir que la inducción de la expresión de *PHO4* en respuesta a arseniato es independiente de Hog1.

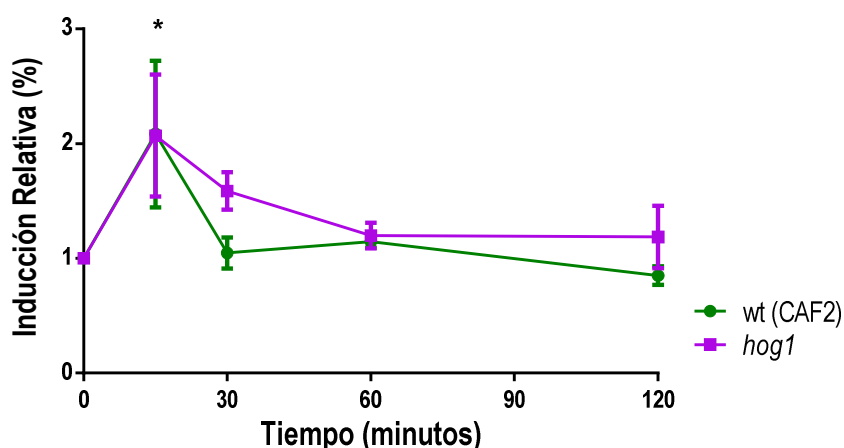


Figura 57. Inducción relativa de la expresión de *PHO4^{pr}-CbLUC* en respuesta a arseniato sódico.

Medida de la expresión de *PHO4^{pr}-CbLUC* en respuesta a 2 mM de arseniato sódico en una cepa silvestre y mutante *hog1*. La gráfica representa la media de la inducción relativa de cada cepa respecto a su tiempo 0 y la barra de error de la desviación estándar de tres experimentos independientes.

IV. Respuesta de *C. albicans* a arsenito (As (III))

El arsenito (estado de oxidación +3 del arsénico), reacciona con los grupos tiol de las proteínas inhibiendo la mayoría de las rutas biológicas y produciendo ROS (especies reactivas de oxígeno), por lo que es uno de los estados del arsénico más tóxico por su efecto cancerígeno y teratogénico. El arsenito, al ser similar estructuralmente al glicerol es transportado al interior de las células a través de aquaglicerolporinas (Liu *et al.*, 2002).

En *S. cerevisiae* esta molécula entra en las células a través de la aquaglicerolporina Fps1, que es un canal bidireccional por el que también se expulsa el As (III) intracelular (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010; Wysocki *et al.*, 2001). El As (III) es eliminado del

citoplasma a través del transportador Acr3/Arr3 (Wysocki *et al.*, 1997) o por su conjugación con glutatión y posterior transferencia a vacuola gracias al transportador vacuolar Ycf1 (Ghosh *et al.*, 1999). La expresión de estas proteínas está controlada por los factores de transcripción Yap1 y Yap8 o Arr1 (Bouganin *et al.*, 2001) (Menezes *et al.*, 2008).

En los ensayos anteriores hemos podido comprobar que *C. albicans* es capaz de percibir y responder frente al arseniato y nos preguntamos si *C. albicans* sería también capaz de notar y señalar la presencia de arsenito y que papel podría desempeñar Pho4 y las rutas de transducción de señales.

a) Implicación de Pho4 en respuesta a arsenito

Para comprobar si Pho4 podría desempeñar alguna función en la respuesta a As (III) realizamos ensayos de sensibilidad/resistencia en placa frente a distintas concentraciones de As (III), tanto del mutante *pho4* como del mutante con una copia ectópica de *PHO4*. Observamos que, al igual que pasaba con el resto de estreses mostrados anteriormente, (NaCl, H₂O₂, menadiona y As (V)) el mutante *pho4* vuelve a mostrar una clara susceptibilidad a arsenito (Figura 58). Por el contrario *PHO4^{reint}* revierte esta susceptibilidad al mostrar una resistencia similar a la presentada por la cepa parental.

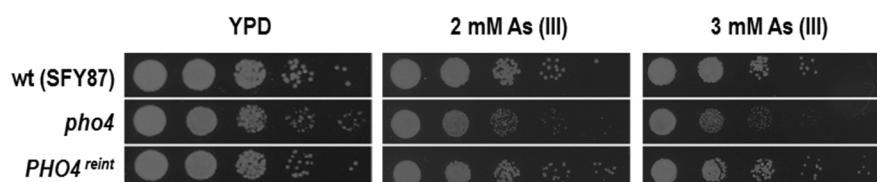


Figura 58. Respuesta de la delección de *PHO4* frente arsenito sódico en *C. albicans*.

Diluciones seriadas de cultivos en fase estacionaria fueron sembrados en placas de medio rico YPD suplementadas con 2 y 3 mM de arsenito sódico. Tras 24 horas de incubación a 37°C las placas fueron escaneadas.

Analizamos igualmente el patrón de fosforilación de MAP quinasas para comprobar si estas se activan o no en presencia de As (III) y si existen diferencias entre el mutante y la cepa parental. Llevamos a cabo una cinética de exposición a arsenito, en la que cultivos en fase exponencial (D.O. = 1) eran expuestos a 2 mM de arsenito sódico durante 30 minutos. Tras la recogida de muestras antes de la adición del arsenito y tras 5, 15 y 30 minutos de exposición, fueron tratadas como se indica en Materiales y Métodos para su posterior análisis.

Resultados

En la Figura 59, puede observarse como existe una activación de Hog1 a los cinco minutos en presencia de este compuesto, y, esto sucede tanto en la cepa parental como en los mutantes. La fosforilación de Hog1 se mantiene con el tiempo (durante los 30 minutos que dura el ensayo). También se puede observar la activación de Mkc1 tras los primeros cinco minutos de exposición. Al igual que ocurre en presencia de arseniato observamos cómo tras los primeros cinco minutos de exposición a arsenito la proteína Pho4-myc se encuentra ligeramente por encima del resto de tiempos lo que representa un mayor peso molecular debido probablemente a una fosforilación de la misma.

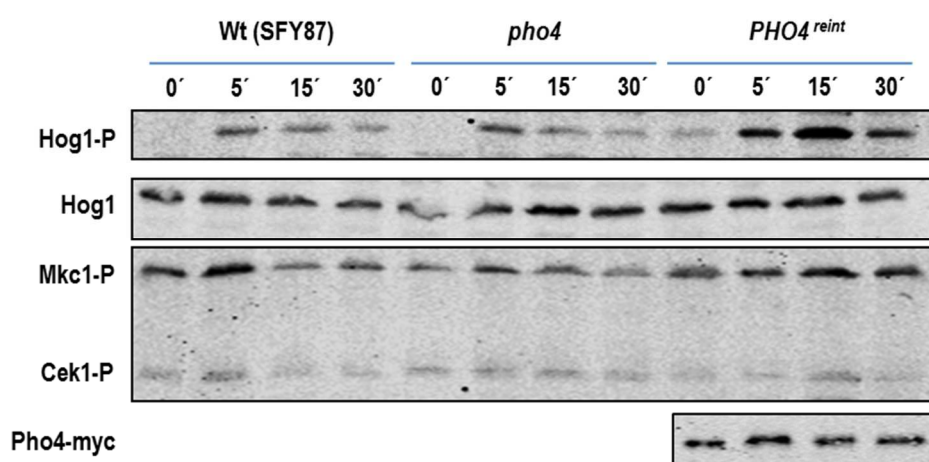


Figura 59. Activación de Hog1 y Mkc1 en presencia de arsenito (As (III)).

Cinética de fosforilación de MAPKs realizada cuando los cultivos de las cepas SFY87, *pho4* y *PHO4^{reint}* habían alcanzado una D.O. = 1. Tras recoger la muestra control (tiempo 0, antes de adicionar el As (III)), se adiciona 2 mM de arsenito sódico y se recogen muestras a 5, 15 y 30 minutos. Tras su tratamiento se analizan mediante inmunodetección la fosforilación de Hog1 (Hog1-P), Mkc1 (Mkc1-P) y Cek1 (Cek1-P) y la movilidad de Pho4-myc (Anti-myc). Como control de carga se incubaron las muestras con el anticuerpo que reconoce la proteína Hog1 total.

Cuantificamos si el arsenito tiene algún efecto en la expresión de *PHO4*. Para ello, analizamos los niveles de expresión tras 1 hora en presencia de 2 mM de arsenito sódico. La medición de la expresión se llevó a cabo en las cepas CAF2 y *hog1* que previamente habían sido transformadas con un plásmido que contenía la región promotora de *PHO4* fusionada al gen de la luciferasa *CbLUC*.

Los resultados de dichos ensayos se muestran en la Figura 60. A diferencia del comportamiento con el arseniato, se observa un ligero descenso de la expresión de *PHO4* tras pasar quince minutos (valor de 0.85) que se recupera alcanzando nuevamente niveles basales tras 60 minutos de exposición (valor de 1.13). Por el contrario en el mutante *hog1*

los niveles de expresión de *PHO4* decaen durante todo el ensayo (0.8 a los quince minutos, 0.5 de los 60 minutos), encontrando en este último punto diferencias significativas entre ambos fondos genéticos (** = $P < 0.001$).

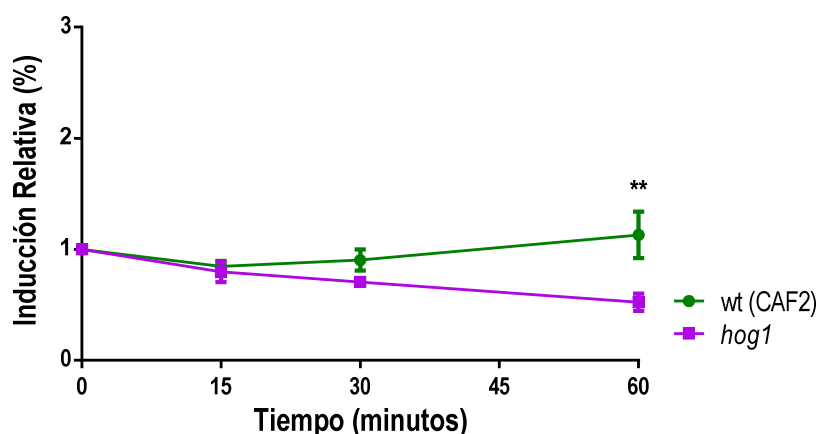


Figura 60. Expresión de *PHO4^{pr}-CbLUC* en presencia de arsenito.

Cinética de la inducción relativa de la expresión de *PHO4^{pr}-CbLUC* en respuesta a 2 mM de arsenito sódico (As (III)) en una cepa silvestre y en el mutante *hog1* respecto al basal de cada cepa. Las muestras fueron recogidas tras 15, 30 y 60 minutos tras la adición del As (III) para después cuantificar los niveles de expresión en el luminómetro.

b) La ruta HOG está implicada en la respuesta a arsenito

En *S. cerevisiae* se ha descrito que la ruta HOG está implicada en la señalización de la respuesta a arsenito y Hog1 es fosforilado en presencia de arsenito (Sotelo and Rodriguez-Gabriel, 2006). Ello implica el control de genes involucrados en esta respuesta así como la modulación de Fps1 (el canal bidireccional que media tanto la entrada como la salida de arsenito de la levadura) (Thorsen *et al.*, 2006).

En *C. albicans* Smith y colaboradores describieron en 2004 que el mutante *hog1* es sensible a Na_2As_3 y que Hog1 se fosforila en presencia de 2 mM de As (III) (Smith *et al.*, 2004). Nosotros nos planteamos conocer la implicación de la ruta HOG en la respuesta a arsenito.

Para ello, analizamos la sensibilidad/resistencia de los distintos componentes de la ruta HOG al arsenito. Realizamos ensayos de sensibilidad en placa frente a 3 mM de As (III) de los mutantes defectivos en los componentes de esta ruta (Figura 61). Todos los mutantes ensayados fueron sensibles a la presencia de As (III) salvo el mutante *sko1* cuyo comportamiento fue similar a la cepa silvestre (al igual que le ocurre frente a otros tipos de

Resultados

agentes estresantes). El doble mutante *hog1 sko1* posee un fenotipo de sensibilidad más acusado que el del mutante *hog1*. Estos datos sugieren que la ruta HOG tiene un papel en la respuesta frente a arsenito en *C. albicans* y que *Sko1* también podría estar implicado en esta función.

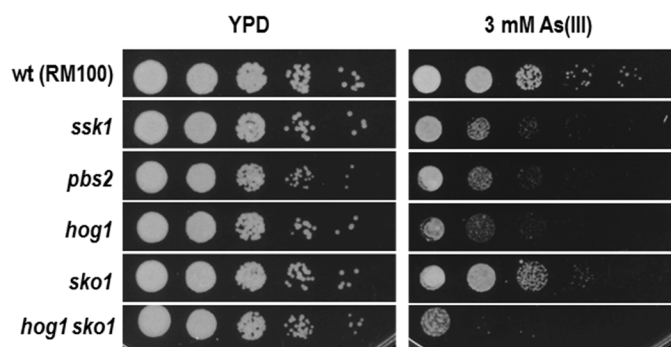


Figura 61. Respuesta de mutantes en elementos de la ruta HOG en presencia de arsenito sódico.

Partiendo de cultivos en fase estacionaria de la cepa silvestre (RM100) y de los mutantes en la ruta HOG *ssk1*, *pbs2*, *hog1*, el factor de transcripción *sko1* y el doble mutante *hog1 sko1*, se siembran diluciones seriadas en forma de gotas en placas de YPD suplementadas con 3 mM de arsenito sódico. Tras 24 horas de incubación a 37°C se escanearon.

Para analizar la fosforilación de Hog1 en presencia de arsenito, realizamos un ensayo que consistió en la adición de 2 mM de As (III) a un cultivo creciendo en fase exponencial, del cual se tomaron muestras a tiempo 0 (control), 5, 15 y 30 minutos. Existe una fosforilación de Hog1 tras los primeros cinco minutos de exposición y ésta dura hasta los treinta minutos de exposición (tiempo máximo ensayado) (Figura 62). Es de destacar que en un mutante *ssk1* existe fosforilación de Hog1, a diferencia de lo que sucedía en presencia de arseniato. Esta fosforilación es más intensa y más corta en el tiempo desapareciendo pasados los quince minutos de tratamiento. Estos datos indican que la fosforilación de Hog1 es independiente de *Ssk1* lo que indica que la señalización a Hog1 tiene lugar por otros elementos no identificados en este momento.

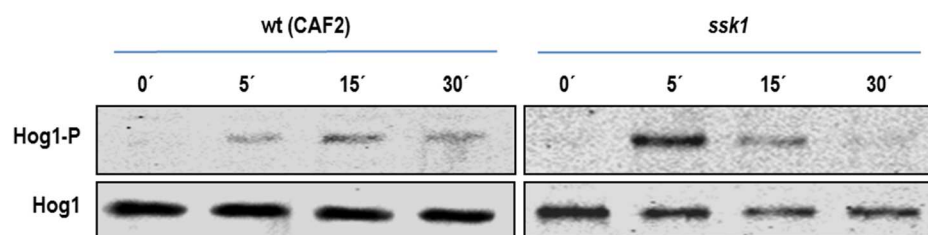


Figura 62. Fosforilación de Hog1 en un mutante *ssk1* en respuesta a arsenito.

Western-blot de la cinética de fosforilación de Hog1 en presencia de 2 mM de arsenito sódico en una cepa silvestre (CAF2) y un mutante *ssk1*. Tras la adición del arsenito (As (III)) se recogieron muestras a los 5, 15 y 30 minutos, se procesaron y analizaron por inmunodetección. Mediante el uso de anticuerpos se detectó la fosforilación de Hog1 (Hog1-p) y la presencia de proteína Hog1 que se usó como control de carga.

Para determinar la vía de entrada de señalización a Hog1 en respuesta a arsenito analizamos la fosforilación de Hog1 en otros componentes de señalización como la MAP quinasa quinasa Ssk2, la MAP quinasa quinasa Pbs2, y otros mutantes de señalización como el doble mutante *sho1 ssk1* y el cuádruple mutante *sho1 ssk1 msb2 opy2*. Sometimos a los mutantes a un tratamiento con 2 mM de arsenito sódico durante 5 minutos, transcurridos los cuales se recogieron las muestras y se trataron para su posterior análisis por inmunodetección.

Los resultados de la fosforilación de Hog1 pueden observarse en la Figura 63. En los mutantes pertenecientes al módulo de las MAP quinasas (*ssk2* y *pbs2*) no se observa fosforilación de Hog1 como era de esperar, por lo que la fosforilación de Hog1 depende de este módulo para su activación. Por el contrario, sí que vemos fosforilación tanto en el doble mutante *sho1 ssk1* como en el cuádruple mutante *sho1 ssk1 msb2 opy2*, lo que nos sugiere que la fosforilación de Hog1 depende de una vía alternativa a la vía canónica siendo independiente tanto de Ssk1 como de Sho1-Msb2-Opy2.

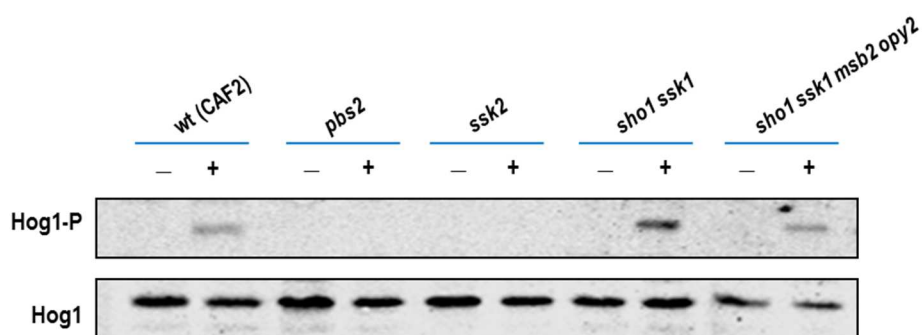


Figura 63. Fosforilación de Hog1 en respuesta a arsenito en distintos mutantes de señalización.

Cultivos en fase exponencial fueron sometidos a 2 mM de arsenito sódico durante cinco minutos, para posteriormente recoger y tratar las muestras para su análisis por inmunodetección. Detección de Hog1 fosforilados (Hog1-P) y como control de carga se incubaron las muestras con el anticuerpo que reconoce la proteína Hog1 total.

V. Producción de especies reactivas de oxígeno por parte de compuestos de arsénico

a) El arsénico produce ROS en *C. albicans*

Uno de los mecanismos que se han descrito por los que el arsénico es cancerígeno es por su capacidad para generar de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) causando daños a nivel de DNA por mutagénesis y por evitar que la maquinaria de reparación de daños funcione correctamente. En *S. cerevisiae* se ha descrito que el arsenito es capaz de producir ROS (Litwin *et al.*, 2013) aunque a niveles inferiores que el peróxido de hidrógeno o la menadiona.

Nosotros nos planteamos comprobar si en *C. albicans* el arsénico también es capaz de producir dichas ROS. Para ello llevamos a cabo ensayos de medición de la producción de especies reactivas de oxígeno intracelular con ayuda de la dihidrofluoresceína diacetato (DHF) (Diaz *et al.*, 2003) y también cuantificamos la variación en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) empleando Rodamina 123.

En una cepa silvestre (SFY87) comprobamos si tanto el arseniato como el arsenito eran capaces de producir ROS. Para ello tratamos 1×10^6 levaduras/ml a 10 mM de peróxido de hidrógeno, 4 mM de arseniato sódico y 4 mM de arsenito sódico en medio YPD. Pasados los primeros 30 minutos (en el caso del experimento de 60 minutos) y transcurridos 60 minutos (en el caso del experimento de 90 minutos) se les añadió 50 μ M de

dihidrofluoresceína diacetato (DHF) y se siguieron incubando otros 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavaron las muestras con PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos de ambos experimentos pueden verse en la Figura 64. El panel A se corresponde con la medida de ROS intracelular medida con DHF. La presencia de 10 mM de peróxido de hidrógeno induce un aumento significativo de la fluorescencia media y, por tanto, un aumento de ROS intracelulares. En el histograma correspondiente a peróxido de hidrógeno se observa la aparición de dos poblaciones con concentraciones distintas de ROS intracelulares. La tinción simultánea con IP indica que no se corresponde con que las células estén vivas o muertas (datos nos mostrados). Este patrón se repitió en los distintos ensayos. Sin embargo, a los 60 minutos no existe un aumento en la generación de ROS respecto al basal (línea negra continua) ni en presencia de arseniato ni de arsenito. Sí que podemos observar un ligero desplazamiento de fluorescencia media a los 90 minutos de exposición a arseniato y arsenito aunque sin alcanzar los niveles obtenidos con el H₂O₂ pero comparables con los descritos en trabajos anteriores con *S. cerevisiae* (Litwin *et al.*, 2013). Estos resultados indican que ambos compuestos arsenito y arseniato generan especies reactivas de oxígeno en *C. albicans*.

También analizamos si estos compuestos afectan al potencial de membrana mitocondrial (Figura 64.B). Para ello realizamos el mismo ensayo solo que en esta ocasión se añadía 20 mM de Rodamina 123 (R123) en lugar de DHF. En este caso todos los compuestos analizados generan un aumento en los niveles de fluorescencia de la Rodamina 123 tanto a los 60 minutos como a los 90 minutos. Por ello podemos concluir que tanto el arseniato (As (V)) como el arsenito (As (III)) aumentan el potencial de membrana mitocondrial al igual que el peróxido de hidrógeno, aunque a niveles inferiores.

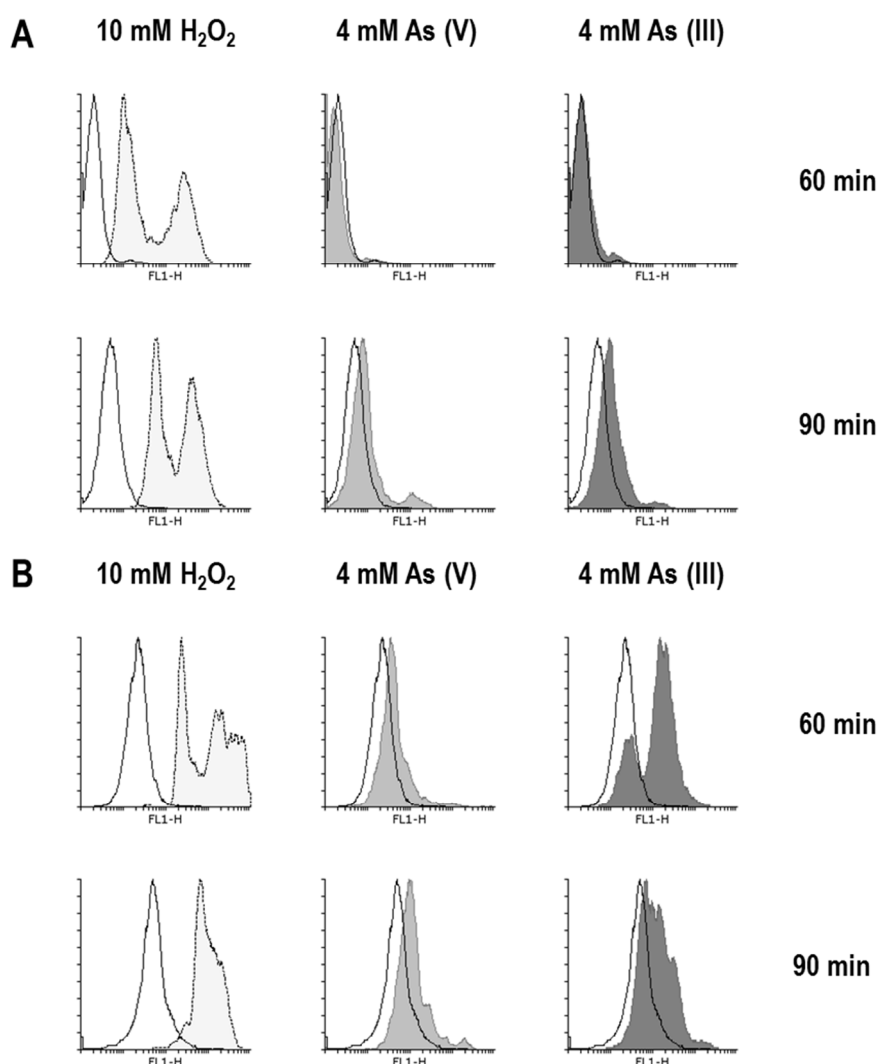


Figura 64. Cuantificación de ROS producido por compuestos inorgánicos de arsénico y variación en el potencial de membrana mitocondrial.

Un cultivo en fase exponencial de crecimiento se expuso durante 60 y 90 minutos a 10 mM de peróxido de hidrógeno, 4 mM de As (V) o 4 mM de As (III), incubándose a 37°C en YPD. Faltando 30 minutos para el final del ensayo se adicionó 50 mM de dihidrofluoresceína diacetato (DHF) (panel A) o 20 mM de Rodamina 123 (R123) (panel B) y se volvieron a incubar. Finalizados los tiempos de exposición se lavaron las muestras dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS para a continuación analizarse mediante citometría de flujo. La línea negra continua representa los niveles basales de la cepa.

b) En el mutante *pho4* la producción de ROS por arsénico es menor

Después de averiguar que el arseniato y el arsenito son capaces de generar ROS y de incrementar el potencial de membrana mitocondrial en una cepa silvestre, quisimos saber qué ocurriría en el caso del mutante *pho4*. En este caso los ensayos se llevaron a cabo solo a los 90 minutos ya que como vimos en la cepa silvestre es cuando se detecta el incremento en dichos niveles.

La producción de ROS medida con DHF en el mutante *pho4* es inferior a la que se produce en la cepa parental cuando la exponemos tanto a arseniato como a arsenito, teniendo unos valores muy similares a los basales o incluso ligeramente inferiores (Figura 65.A). En cambio cuando se le somete a peróxido de hidrógeno estos niveles se vuelven a elevar como ocurre en la cepa silvestre. En la cepa reintegrante *PHO4^{reint}* los niveles de ROS producidos se asemejan mucho a los obtenidos en un mutante *pho4*, siendo ligeramente inferior en las especies oxidativas del arsénico si los comparamos con los niveles basales, mientras que de nuevo en presencia de peróxido de hidrógeno aumentan.

Con una producción inferior de especies reactivas de oxígeno por parte del mutante *pho4* en presencia tanto de arseniato como de arsenito nos preguntamos si la mitocondria estaría sufriendo daños. Realizamos el mismo ensayo, pero esta vez empleamos Rodamina 123 para poder cuantificar de manera indirecta el potencial de membrana mitocondrial mediante la acumulación de R123 en el interior mitocondrial.

Al igual que ocurría con la producción de ROS tanto el mutante *pho4* como el reintegrante poseen unos niveles de fluorescencia muy similares a los basales (línea negra continua) cuando se expone a arseniato o arsenito (Figura 65.B). En presencia de peróxido de hidrógeno sí se observa un aumento del potencial de membrana similar al detectado en la cepa silvestre.

Por tanto, en el mutante *pho4* así como en el reintegrante, ni el arseniato ni el arsenito generan ROS en las condiciones ensayadas al contrario de lo que sucede en la cepa parental o con peróxido de hidrógeno donde sí se detecta un aumento significativo de ROS intracelulares. Este hecho estaría relacionado con que tampoco exista un aumento en los niveles de fluorescencia de la Rodamina 123.

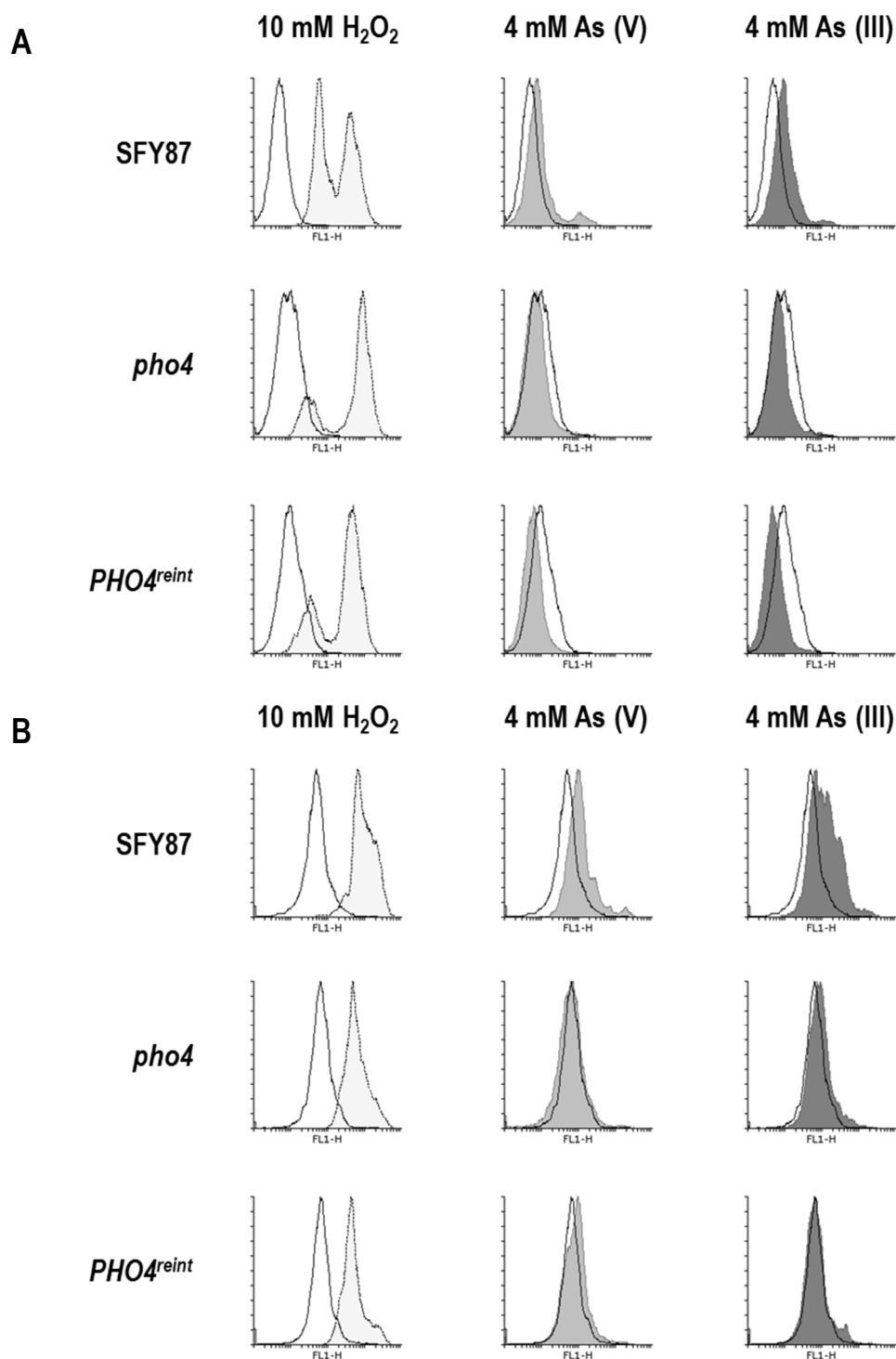


Figura 65. Cuantificación de ROS en presencia de arseniato y arsenito en *C. albicans*.

Las cepas SFY87, *pho4* y *PHO4^{reint}* en fase exponencial se expusieron durante 90 minutos a 10 mM de peróxido de hidrógeno, 4 mM de As (V) o 4 mM de As (III), incubándose a 37°C en YPD. Faltando 30 minutos para el final del ensayo se adicionó 50 µM de dihidrofluoresceína diacetato (DHF) (A) o con 20 µM de Rodamina 123 (R123) (B) y se volvieron a incubar. Finalizados los tiempos de exposición se lavaron las muestras dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS, a continuación se analizaron mediante citometría de flujo. La línea negra continua representa los niveles basales de la cepa.

D. Relación de Pho4 con el metabolismo oxidativo

I. Estudio de la respuesta a estrés en distintas condiciones ambientales de un mutante *pho4*

Para tratar de caracterizar más a fondo el factor de transcripción Pho4 y ante su comportamiento similar con la cepa silvestre en los modelos de infección de *G. mellonella* y en los modelos *ex vivo* con células del sistema inmunitario, decidimos analizar su comportamiento en distintas condiciones ambientales (aerobiosis, microaerofilia, anaerobiosis y atmósfera aeróbica suplementada con un 5 % de CO₂). Estas condiciones fueron elegidas debido a que en los ensayos *ex vivo* la incubación se realiza en una cámara que crea una atmósfera con un 21 % de O₂ y un 5 % de CO₂ y porque en su nicho normal (tracto gastrointestinal y vaginal) *C. albicans* se encuentra en ambientes microaerófilos o anaeróbicos. Realizamos ensayos *in vitro* para comprobar si la susceptibilidad del mutante *pho4* a los distintos tipos de estrés podía verse alterada en las distintas condiciones de presencia/ausencia de O₂ y CO₂ y si el crecimiento dependía de estas condiciones.

Cuando incubamos el mutante *pho4* en presencia de O₂ y 5 % de CO₂, la susceptibilidad de *pho4* frente a NaCl y arseniato se revierte, alcanzando en el caso del arseniato unos niveles de resistencia superiores a los de la cepa silvestre y el reintegrante. En presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o la menadiona el comportamiento dependía del agente oxidante: el peróxido de hidrógeno también revierte la sensibilidad del mutante mientras que en las placas con menadiona se observa una disminución de la sensibilidad con respecto a las cepas control (Figura 66).

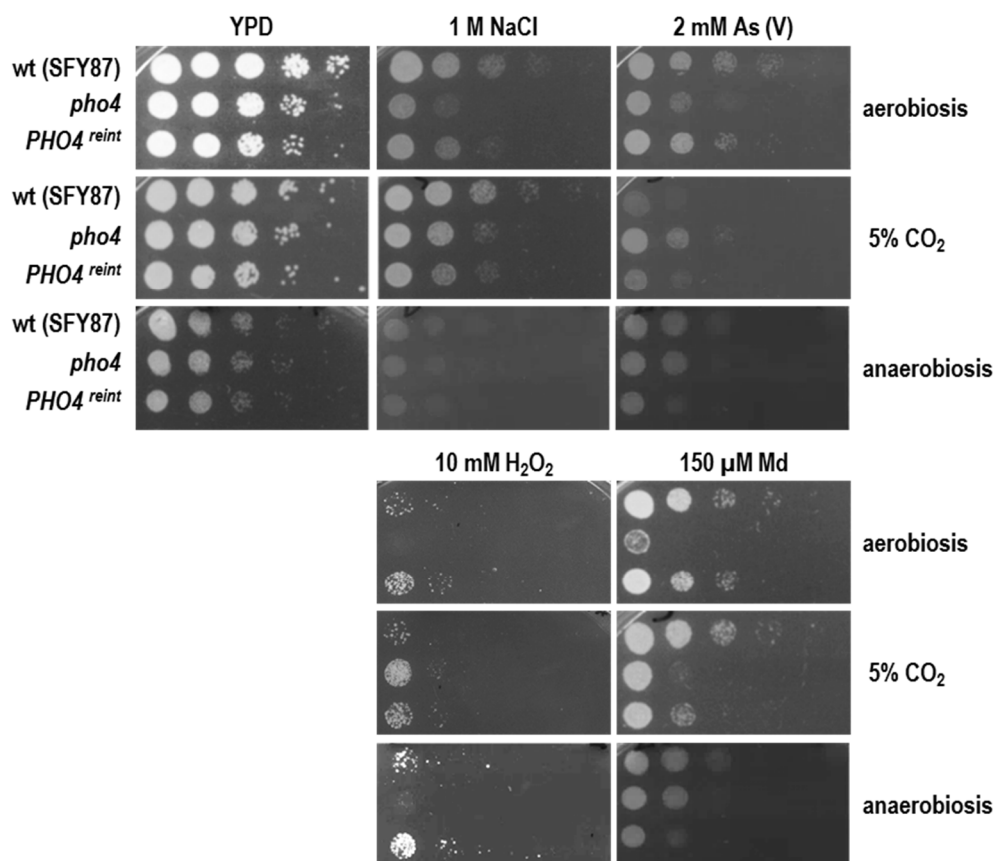


Figura 66. Efecto del O₂ y CO₂ en la sensibilidad a diversos tipos de estrés.

Se realizaron ensayos de siembra en gota en placas de YPD suplementadas con 1 M de NaCl, 2 mM de arseniato sódico (As (V)), 10 mM de peróxido de hidrógeno y 150 μM de menadiona (Md). Las placas fueron incubadas en los siguientes ambientes: aerobiosis = 37°C durante 24 horas, 5 % CO₂ = estufa con 21 % de O₂ y 5 % de CO₂, 37°C durante 24 horas y anaerobiosis = jarra anaeróbica con sobre GENbox anaer a 37°C durante 48 horas. Transcurridos los tiempo de incubación indicados anteriormente se escanearon.

También incubamos las placas en un ambiente de anaerobiosis (ambiente conseguido empleando jarras de anaerobiosis y sobres generadores de atmósfera anaerobia GENbox (véase más detallado en Materiales y Métodos)). En este caso observamos que los fenotipos que observamos en condiciones aerobias o de 5 % de CO₂ se ven anulados, mostrando las tres cepas el mismo comportamiento en presencia de cualquier tipo de estrés, salvo en presencia de menadiona y arseniato donde el reintegrante es un poco más susceptible.

Estos datos indican que la presencia de 5 % de CO₂ o la ausencia de O₂ revierten algunos fenotipos de sensibilidad del mutante *pho4*, lo que sugiere que Pho4 no es relevante en estas condiciones específicas de crecimiento.

II. Efecto de inhibidores de la cadena respiratoria sobre un mutante *pho4*

Las reacciones del catabolismo de las células aeróbicas convergen en la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria y la ATP sintasa. Partiendo de la oxidación del NADH y FADH₂ obtenidos en el metabolismo se genera un gradiente de protones que es aprovechado por la ATP sintasa para sintetizar el ATP. La cadena transportadora de electrones consiste en cuatro complejos enzimáticos a través de los cuales son transportados secuencialmente los electrones mediante reacciones redox. Estos complejos enzimáticos son el complejo I (NADH-Q reductasa), complejo II (Succinato-Q deshidrogenasa), complejo III (Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa) y el complejo IV (Citocromo C oxidasa). Éstos pueden ser inhibidos por distintos compuestos como la rotenona (complejo I), antimicina A (complejo III) y el cianuro potásico y la azida sódica que inhiben el complejo (IV), por lo que las células son incapaces de sintetizar ATP y acaban muriendo por falta de energía.

En plantas y hongos existe además de la cadena respiratoria tradicional una ruta alternativa conocida como ruta AOX (oxidasa alternativa). Esta ruta transporta los electrones desde el ubiquinol al oxígeno saltando desde el complejo I hasta el aceptor final de electrones, esto permite a las células generar ATP aunque en menor medida que la producida a través de la cadena respiratoria clásica.

Después de observar que algunos fenotipos de sensibilidad del mutante *pho4* eran revertidos en los ambientes en que había una concentración más alta de CO₂, o en ausencia de O₂ nos preguntamos si Pho4 pudiera tener algún efecto sobre el metabolismo oxidativo de la levadura. Por ello realizamos ensayos de sensibilidad en placa frente a compuestos que inhibían la cadena respiratoria y la oxidasa alternativa. A la vez los incubamos en distintas condiciones respiratorias favoreciendo en unas la fermentación y en otras la respiración aerobia, así como en distintas concentraciones de dióxido de carbono.

a) El mutante *pho4* es más sensible a azida sódica

Se ensaya la susceptibilidad frente a un inhibidor de la cadena transportadora de electrones, concretamente a la azida sódica. Este compuesto inhibe el complejo IV o citocromo c oxidasa impidiendo que los electrones lleguen a su aceptor final el O₂. El ensayo lo realizamos a la vez en YPD y YPG agar con o sin suplementar con azida sódica. El medio

Resultados

YPG emplea glicerol como fuente de carbono, una fuente de carbono no fermentable, por lo que la levadura lleva a cabo una respiración aeróbica.

En la Figura 67 podemos distinguir como en condiciones aeróbicas y en presencia de azida sódica el mutante *pho4* es más sensible en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, cuando sometemos las placas a una incubación con más del 5 % de CO₂ o menor concentración de O₂ (véase microaerofilia y anaerobiosis) el crecimiento del mutante es prácticamente nulo. La cepa reintegrante revierte los fenotipos de sensibilidad del mutante *pho4*, siendo capaz de crecer con unos niveles similares a la cepa silvestre. Cuando incubamos las cepas en condiciones anaeróbicas y en presencia de azida sódica observamos que ninguna de las cepas es capaz de crecer.

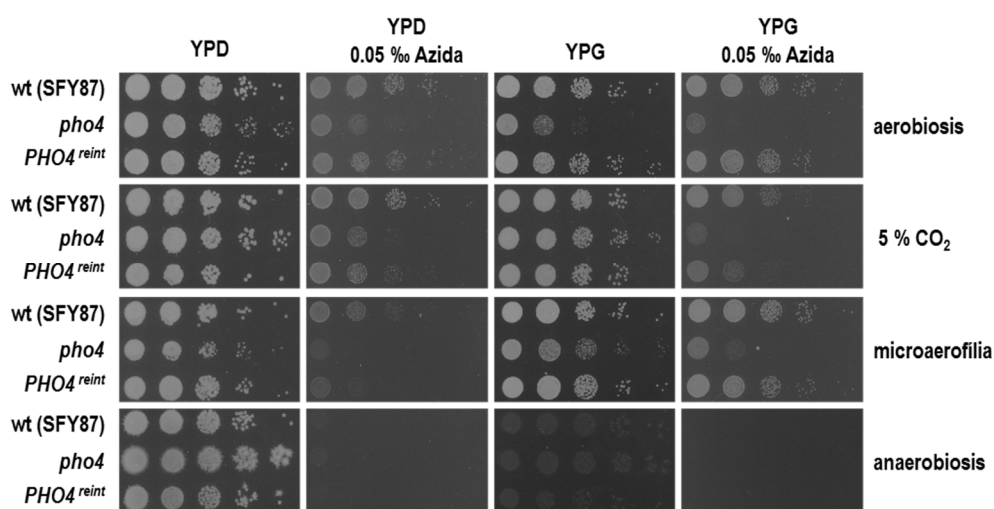


Figura 67. Crecimiento del mutante *pho4* en presencia de azida sódica.

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos de forma seriada y sembrados en forma de gota en placas de YPD y YPG suplementadas con 0.05 % de azida sódica e incubados a 37°C en aerobiosis, estufa con 5 % de CO₂, microaerofilia = jarra microaerofilia con sobre GENbox micro durante 24 horas y en anaerobiosis = jarra anaeróbica con sobre GENbox anaer a 37°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo fueron escaneadas.

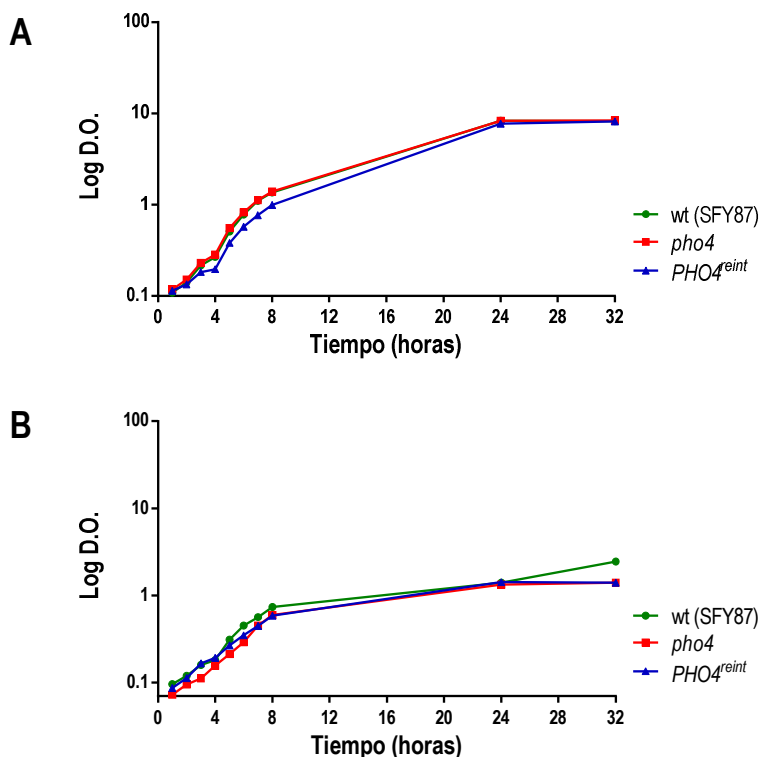
Por otro lado, cuando sembramos las cepas en YPG, los fenotipos observados en el mutante *pho4* en YPD se agravaron. Al contrario de lo que pasa en YPD y en microaerofilia el reintegrante es capaz de revertir el fenotipo y crecer como una cepa silvestre, la cual también crecía mejor en estas condiciones.

Realizamos simultáneamente curvas de crecimiento en medio líquido definido SD y SG de nuestras cepas, para así poder estudiar el comportamiento de estas con dos fuentes

distintas de carbono (Figura 68). En dichas curvas de crecimiento no se apreciaron diferencias en el crecimiento entre las cepas, siendo el crecimiento más lento en medio SG.

Figura 68.
Curvas de
crecimiento de
las cepas
ensayadas en
medio definido
SD y SG.

Representación gráfica del crecimiento a 37°C de las cepas SFY87, *pho4* y *PHO4^{reint}* a lo largo del tiempo en los medios definidos SD (A) y SG (B), mediante la toma periódica de medidas de densidad óptica.



b) El SHAM afecta al crecimiento de mutantes *pho4* en medio YPG

Para evaluar el crecimiento de nuestros mutantes en presencia del inhibidor de la ruta de la oxidasa alternativa utilizamos el ácido salicilhidroxilamínico (SHAM). Para ello, e igual que en el ensayo anterior, realizamos una siembra en gota de un número decreciente de levaduras en medio rico YPD y YPG y lo incubamos en aerobiosis, 5 % de CO₂ y microaerofilia durante 24 horas y en anaerobiosis durante 48 horas.

No existen diferencias de crecimiento entre las cepas ensayadas en presencia de este compuesto en la concentración ensayada en YPD y en condiciones aeróbicas (Figura 69). Es de destacar que, las cepas son ligeramente más sensibles cuando las incubamos en un ambiente con 5 % de CO₂, sensibilidad que disminuye cuando aumenta la concentración de CO₂ y disminuye la de O₂ (microaerofilia y anaerobiosis). Por otro lado, cuando crecemos las cepas en YPG observamos que el mutante *pho4* es sensible a este compuesto en condiciones aeróbicas. No obstante, el mutante *pho4* en condiciones con mayores concentraciones de CO₂ (aunque permanece susceptible a este compuesto) es capaz de crecer ligeramente mejor que en condiciones aeróbicas.

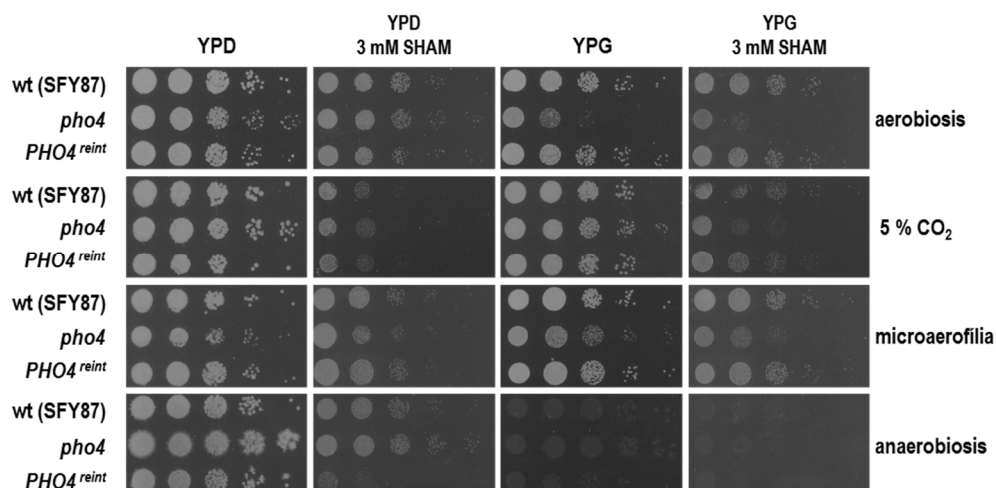


Figura 69. Efecto del inhibidor de la oxidasa alternativa en el crecimiento del mutante *pho4*.

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos de forma seriada y sembrados en forma de gota en placas de YPD y YPG suplementadas con 3 mM de SHAM e incubados a 37°C en aerobiosis, estufa con 5 % de CO₂, jarra de microaerofilia durante 24 horas y en jarra de anaerobiosis durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo fueron escaneadas.

c) En presencia de un 5 % de CO₂ el mutante *pho4* es resistente a arseniato

Dado que el arseniato es un análogo estructural del fosfato pudiendo inhibir la fosforilación oxidativa de la mitocondria, y que el mutante *pho4* presenta distinta sensibilidad a este compuesto dependiendo de la presencia o no de O₂ y CO₂, nos planteamos analizar el comportamiento de este mutante frente a arseniato en medio YPG.

En la Figura 70 podemos observar como en aerobiosis, tal y como se ha apreciado anteriormente en la Figura 50, en presencia de arseniato en el medio el mutante *pho4* es mucho más sensible que la cepa parental o el reintegrante. Este hecho ocurre también en YPG donde además el mutante *pho4* crece más lentamente. Cuando lo incubamos en presencia de un 5 % de CO₂ podemos ver que, al igual que sucede en YPD, el mutante se vuelve resistente a arseniato mientras que la cepa parental y el reintegrante se hacen más sensibles. En cambio, según aumentamos el porcentaje de CO₂ y disminuimos el de O₂ como es el caso de la microaerofilia, observamos que el fenotipo de las cepas vuelve a ser semejante al obtenido cuando las incubamos en un ambiente aeróbico. En condiciones de anaerobiosis no existen diferencias de sensibilidad entre las tres cepas analizadas, tal vez debido a que el crecimiento es más lento.

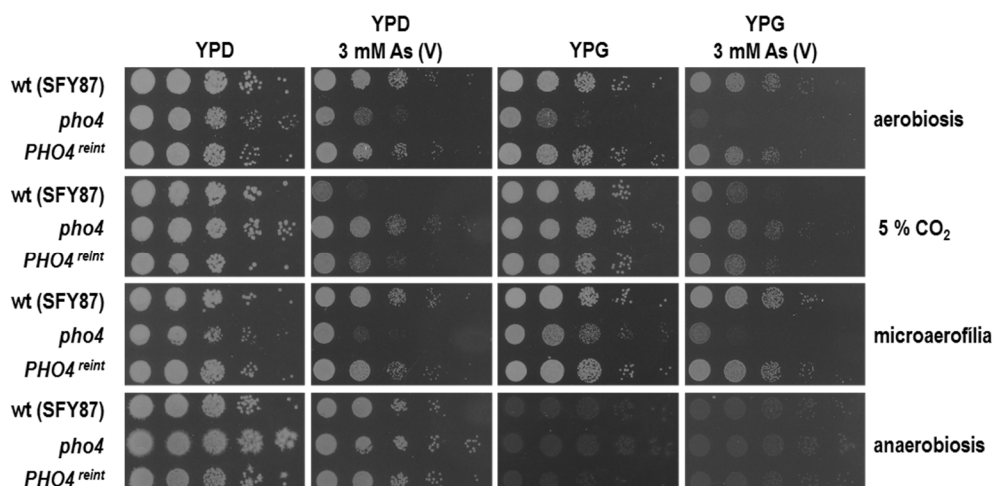


Figura 70. Comportamiento del mutante *pho4* en respuesta a arseniato en medio YPG.

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos de forma seriada y sembrados en forma de gota en placas de YPD y YPG suplementadas con 3 mM de As (V) e incubados a 37°C en aerobiosis, estufa con 5 % de CO₂, jarra de microaerofilia durante 24 horas y en jarra de anaerobiosis durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo fueron escaneadas.

d) El arseniato y la azida sódica tienen efectos aditivos sobre el crecimiento del mutante *pho4*

Para comprobar si las sensibilidades del mutante *pho4* a arseniato y azida tienen efectos complementarios, incubamos nuestras cepas en placas tanto de YPD como de YPG suplementadas con una mezcla de azida sódica y arseniato sódico y con una mezcla de SHAM y arseniato sódico. Igualmente las incubamos en distintas condiciones atmosféricas para así forzar a las células a respirar o fermentar.

En la Figura 71.A puede observarse que, en aerobiosis el mutante *pho4* muestra sensibilidad a la combinación de ambos compuestos. Este efecto es aditivo puesto que la sensibilidad que el mutante *pho4* muestra a la mezcla de arseniato y azida es mayor que la observada en presencia de los compuestos por separado. Es de destacar que en presencia de 5 % de CO₂ el mutante *pho4* muestra sensibilidad a la mezcla de ambos compuestos, es decir, revierte la resistencia a arseniato (Figura 70).

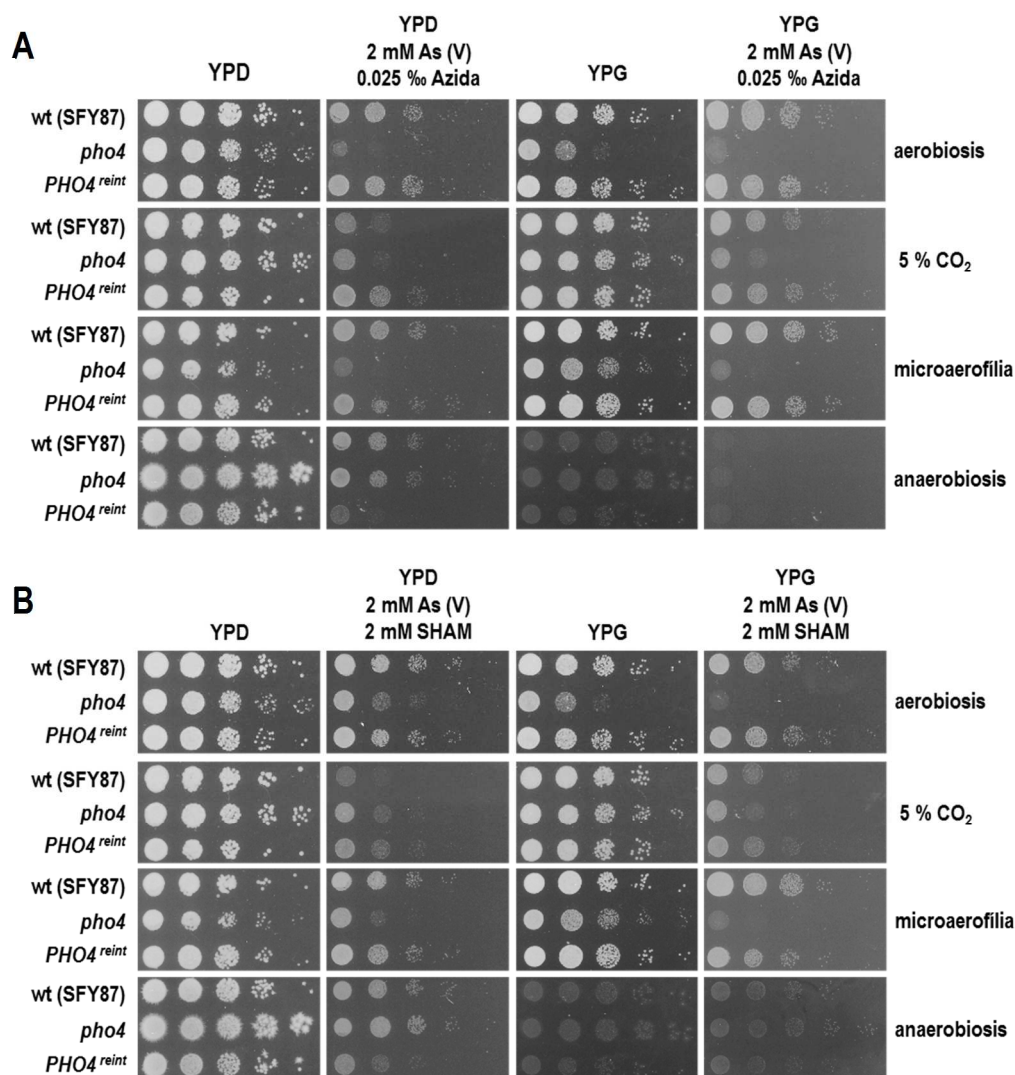


Figura 71. Respuesta de la delección de *PHO4* en la presencia conjunta de arseniato con inhibidores de la respiración.

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos de forma seriada y sembrados en forma de gota en placas de YPD y YPG suplementadas con .025 % de azida sódica + 2 mM de As (V) (Panel A) y 2 mM de SHAM + 2 mM de As (V) (Panel B). Fueron incubados a 37°C en aerobiosis, estufa con 5 % de CO₂, jarra de microaerofilia durante 24 horas y en jarra de anaerobiosis durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo fueron escaneadas.

En el caso del empleo conjunto de SHAM (inhibe la oxidasa alternativa) y el arseniato (afecta la fosforilación oxidativa) observamos (Figura 71.B) que, al igual que en el caso anterior tras incubar las placas con un 5 % de CO₂ la resistencia que observábamos del mutante *pho4* frente al arseniato se ve completamente revertida. En el resto de las condiciones ensayadas con la mezcla los fenotipos obtenidos fueron similares a los obtenidos en presencia del arseniato.

e) Efecto del arseniato y la azida sódica en el potencial de membrana mitocondrial

Puesto que el arseniato aumenta el potencial de membrana mitocondrial en la cepa parental (Figura 65) nos preguntamos qué efecto tenía la azida sódica en este fenómeno. Para estudiar estos efectos, realizamos los ensayos en medio definido SG (cuya fuente de carbono es un azúcar no fermentable, el glicerol y que como se ha comentado anteriormente las células solo pueden respirar). Sometimos a las cepas SFY87, *pho4* y *PHO4^{reint}* a la exposición de 0.025 ‰ de azida sódica, 4 mM de arseniato sódico y a una mezcla de ambos compuestos durante 90 minutos; transcurridos los primeros 60 minutos se les añadió la Rodamina 123.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 72. La azida sódica produce un descenso en el potencial de membrana mitocondrial debido a una despolarización de la misma como puede observarse en la cepa SFY87. Observamos también que tal y como habíamos descrito anteriormente, el arseniato produce un aumento del potencial de membrana que no tiene lugar en presencia de azida sódica.

El mutante *pho4* disminuye su potencial de membrana tanto en presencia de azida sódica como de azida sódica y arseniato, comportándose de forma similar a la cepa parental.

Curiosamente, la cepa reintegrante muestra un comportamiento distinto a las otras dos cepas. La azida sódica tiene un efecto muy ligero o no disminuye el potencial de membrana medio con Rodamina 123, mientras que el arseniato disminuye este potencial. Este fenotipo, junto con otros descritos anteriormente como la fosforilación basal de Hog1 indican que el nivel de expresión de *PHO4* es importante tanto para su función como para la célula en su conjunto.

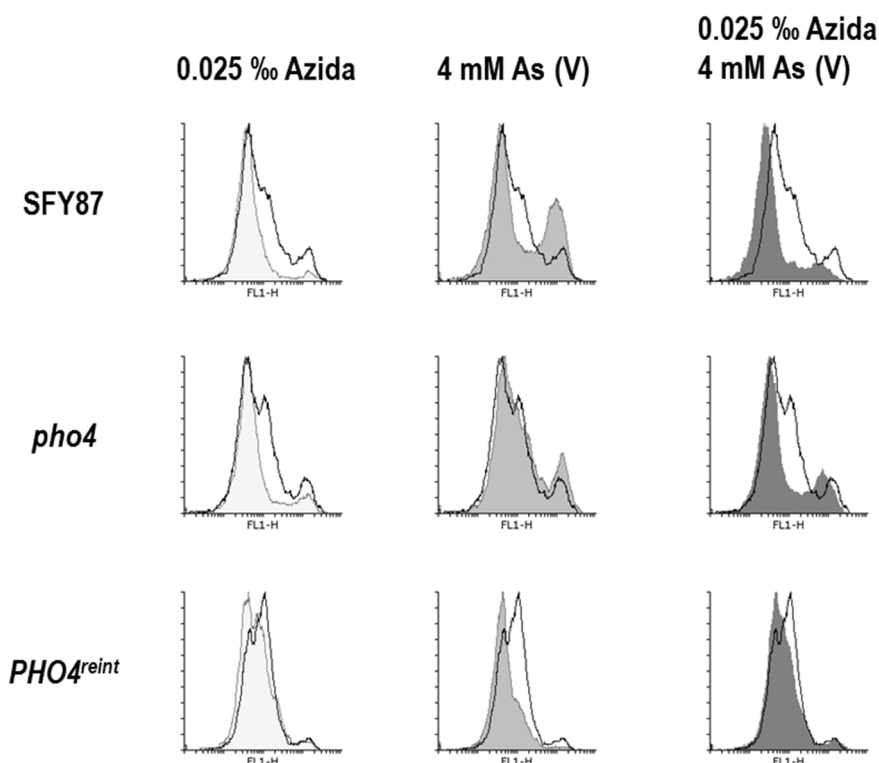


Figura 72. Cuantificación del potencial de membrana en presencia de azida sódica.

Medida de la fluorescencia emitida por la acumulación de R123 en el interior de la mitocondria en presencia de 0.025 ‰ de azida sódica, 4 mM de As (V) y 0.025 ‰ de azida sódica + 4 mM de As (V) durante 90 minutos de exposición. Se lavan dos veces las muestras con PBS y se resuspenden en PBS para su análisis por citometría de flujo. El potencial de membrana mitocondrial en condiciones basales se corresponde con la línea negra continua.

E. Colonización del mutante *pho4* en un modelo murino de comensalismo

En ensayos de colonización en competición en el modelo de comensalismo previamente descrito (Resultados 1.C) (Prieto *et al.*, 2014) observamos que el mutante *pho4* presentaba defectos en su capacidad de establecerse como comensal. Dado que estos ensayos se realizaron de forma preliminar y usando dos cepas (competición) en el mismo ratón nos planteamos ensayar si el factor de transcripción Pho4 sería capaz de colonizar el tracto gastrointestinal del ratón en solitario. Para ello empleamos el mutante *pho4* marcado con la proteína roja fluorescente dTOM2 (*pho4*-dTOM2) (Prieto *et al.*, 2014) para poder llevar a cabo su seguimiento una vez inoculado en el ratón. Se administró un inóculo único de 10^7 levaduras por vía oral a los ratones sometidos a un tratamiento con antibióticos previo

de cuatro días (véase más detallado en Materiales y Métodos) y manteniendo dicho tratamiento hasta el final del experimento.

Los resultados obtenidos (Figura 73) muestran como el mutante *pho4* al contrario de lo que sucede con otros mutantes sensibles a estrés oxidativo, es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal de ratón. Este mutante alcanza unos niveles de colonización muy similares a los que muestra la cepa parental CAF2 (Prieto *et al.*, 2014), manteniéndose dichos niveles constantes a lo largo de todo el experimento. Por tanto, Pho4 es prescindible para la colonización del tracto gastrointestinal por *C. albicans*.

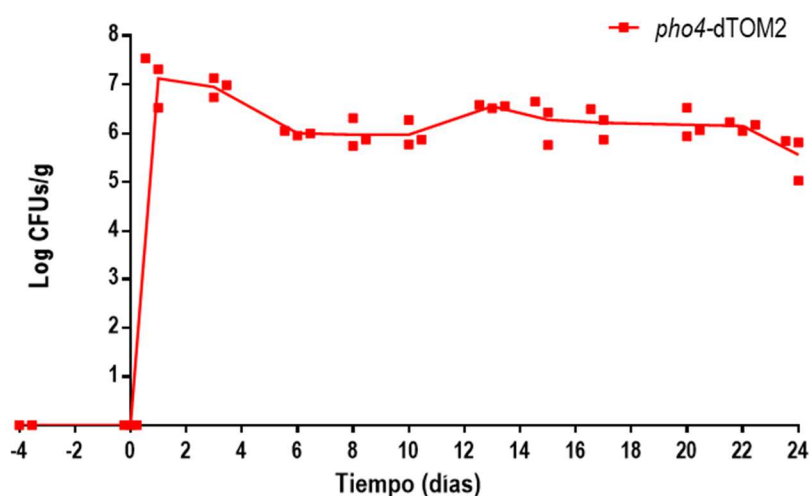


Figura 73. Nivel de colonización del tracto gastrointestinal de ratón por un mutante *pho4*.

Tras un tratamiento previo con una mezcla de antibióticos (véase más detallado en Materiales y Métodos) durante 4 días, se inocularon 10^7 levaduras del mutante *pho4*-dTOM2 a día 0 por vía intragástrica a 3 ratones C57BL/6. El nivel de colonización fue seguido en el tiempo analizando las unidades formadoras de colonia (UFCs). En la gráfica se representan los valores logarítmicos de las (UFCs) por gramos de heces, cada valor representa un animal.

Tras concluir el ensayo anterior se sacrificaron los ratones para cuantificar la carga fúngica en las distintas porciones del intestino de ratón. Para ello se analizó *post mortem* el contenido intestinal del intestino delgado proximal (duodeno), del intestino delgado distal (íleon), ciego y colon.

En la Figura 74 podemos observar como *pho4* coloniza mejor los tramos finales del intestino con valores de colonización muy similares entre sí. En el intestino delgado proximal, solo uno de los tres ratones analizados mostró niveles de *pho4*-dTOM2 detectables por recuento de UFCs.

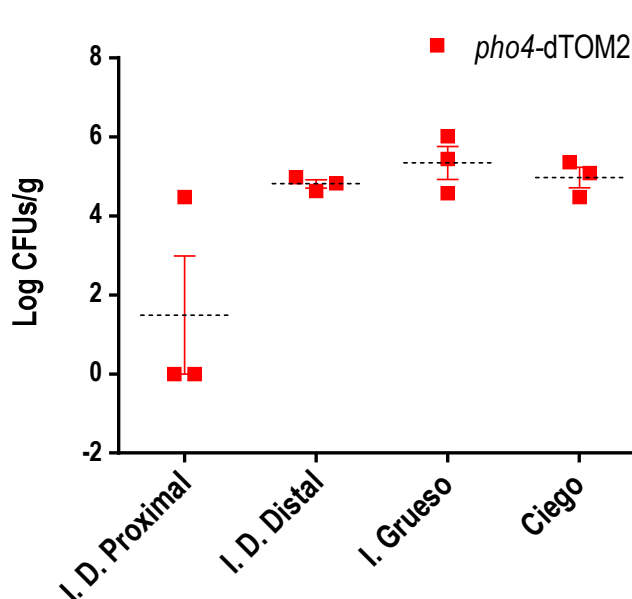


Figura 74. Presencia de *pho4*-dTOM2 en distintas porciones del tracto intestinal.

En la gráfica se representa el número de unidades formadoras de colonias en por gramo de contenido intestinal, en las distintas porciones del tracto intestinal. Se determinó por siembra en medio sólido y recuento de UFCs de la muestra. (Cada valor representa un animal y la barra de error representa la desviación estándar). (I.D. se refiere a intestino delgado).

Dado que el mutante *pho4* presenta cierta dificultad para colonizar el primer tramo del intestino delgado pero, sin embargo, sí lo hace en el resto del tracto intestinal analizamos la sensibilidad de este mutante a un complejo comercial de sales biliares. Una vez dentro del intestino delgado las levaduras deben hacer frente a la presencia de las sales biliares y a un ambiente cada vez más anaeróbico según se avanza por el intestino.

Sorprendentemente en los resultados obtenidos de los ensayos de sensibilidad mediante siembra en gota frente a sales biliares, observamos como el mutante *pho4* es resistente a estos compuestos apreciándose mejor a concentraciones altas (0.3 % de sales biliares) donde la cepa parental y la cepa reintegrante son incapaces de crecer (Figura 75). Las distintas condiciones ambientales no afectan significativamente a la capacidad de resistir a las sales biliares del mutante *pho4*. Tampoco afectan a la sensibilidad tanto de la cepa silvestre como de la cepa reintegrante.

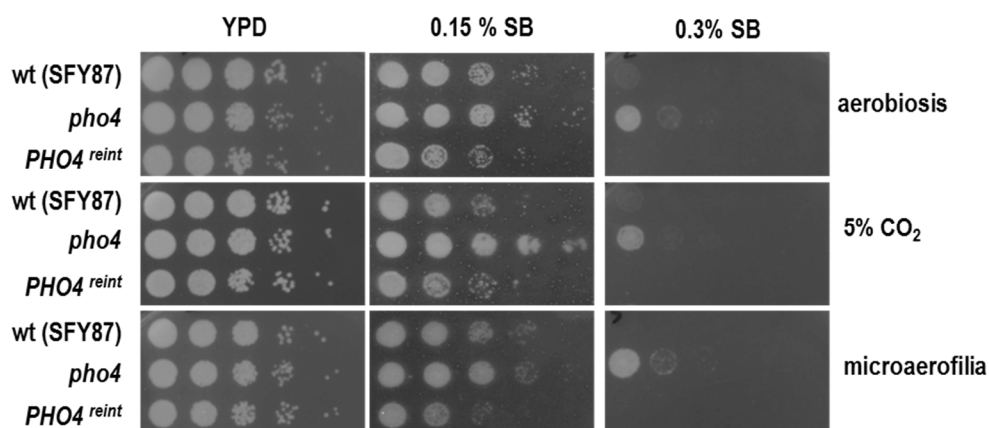


Figura 75. Resistencia de *pho4* a la presencia de sales biliares.

Cultivos en fase estacionaria fueron diluidos de forma seriada y sembrados en gota en placas de YPD suplementadas con 0.15 y 0.3 % de sales biliares. Fueron incubados a 37°C en aerobiosis, estufa con 5 % de CO₂ y jarra de microaerofilia durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación las placas fueron escaneadas.

Estos datos concluyen que aunque el mutante *pho4* coloniza peor el intestino delgado proximal esto no es debido a la presencia de las sales biliares en dicho tramo.

F. Estudio de la capacidad de colonización del mutante *pho4* en competición

Para verificar observaciones preliminares y ahondar en el estudio del factor de transcripción Pho4, estudiamos la capacidad de colonización del tracto intestinal murino de dicho mutante en ensayos de competición con su cepa parental. Para ello se marcaron la cepa parental con GFP (SFY87-GFP) y el mutante con dTOM2 (*pho4*-dTOM2).

I. Colonización del mutante *pho4* en competición con su cepa parental

Tras la inoculación intragástrica de una mezcla de las cepas *pho4* y la parental marcadas (45.65 % de *pho4*-dTOM2 y 54.35 % de SFY87-GFP) a ratones pre-tratados con antibióticos, se siguió la colonización de las cepas mediante el análisis de UFCs en heces durante 24 días.

En la Figura 76 se muestran los resultados obtenidos del seguimiento de la colonización. En ella observamos que la cepa parental SFY87-GFP coloniza a niveles altos (en torno a 7 unidades logarítmicas), manteniéndose a lo largo del tiempo. Este

Resultados

comportamiento es similar al descrito para la cepa parental CAF2-GFP (Prieto *et al.*, 2014). Sin embargo, el mutante *pho4*-dTOM2 solo es capaz de colonizar durante los primeros seis días para luego terminar por desaparecer o no ser detectado en dos de los tres ratones usados en el estudio. Es de destacar que los niveles de colonización alcanzados por el mutante *pho4* en los primeros días (día 0 a día 6) son inferiores a los obtenidos por la cepa parental o a los obtenidos por el mutante cuando no está en competición (véase Figura 73). El mutante *pho4* alcanza niveles de colonización significativamente inferiores a los de la cepa parental en ensayos de competición.

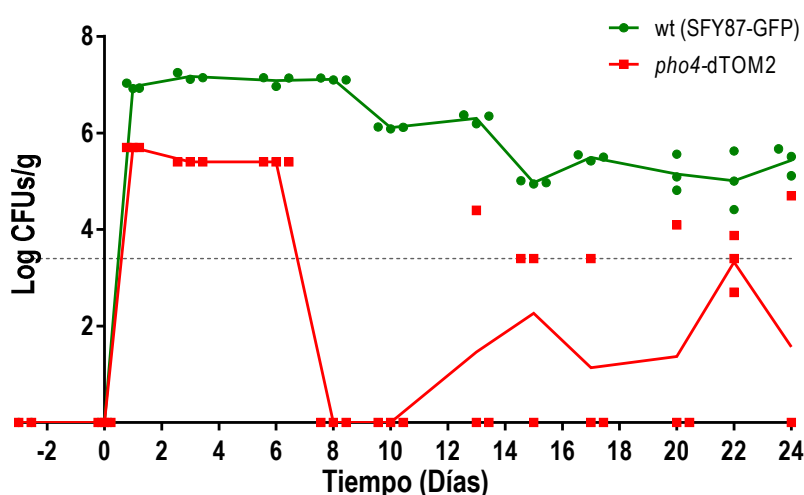


Figura 76. Capacidad de colonización del mutante *pho4* en competición con su parental.

Representación de los valores medios de unidades formadoras de colonia (UFCs) correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos a partir de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección (línea discontinua).

Tras la finalización del ensayo de colonización *in vivo*, se analizó *post mortem* el contenido intestinal de dichos ratones para así corroborar que el mutante *pho4* había sido eliminado del tracto gastrointestinal. Los resultados de dicho análisis (Figura 77) demostraron la presencia de la cepa parental en todas las porciones analizadas, mientras que solo en uno de los tres ratones se detectó la presencia del mutante *pho4*. Los niveles detectados en este ratón fueron similares a los obtenidos en la cepa silvestre. Estos resultados indican que Pho4 participa en la colonización del intestino murino cuando está en competición con la cepa parental.

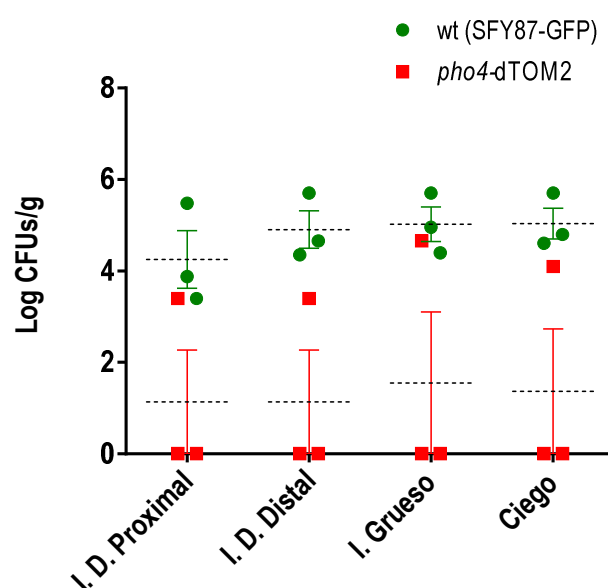


Figura 77. Presencia de la cepa parental y el mutante *pho4* en el lumen intestinal.

Gráfica que representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto intestinal, la cual se determinó por siembra en medio sólido y recuento de UFCs de la muestra. Cada valor representa un animal. (I.D. se refiere a intestino delgado).

II. Crecimiento del mutante *pho4* en competición con la cepa parental

Los resultados obtenidos de los ensayos de colonización del mutante *pho4*, muestran que este es capaz de colonizar y establecerse como comensal únicamente cuando se encuentra en solitario, no inoculado a la vez que su cepa parental. Por ello nos planteamos analizar el comportamiento del mutante *pho4* en competición con su cepa parental en estudios *in vitro*.

Para ello realizamos un seguimiento del crecimiento de ambas cepas mediante una curva de crecimiento por recuento de UFCs y medida de D.O. El ensayo se llevó a cabo con cultivos mixtos de la cepa parental por un lado (SFY87-GFP y SFY87-dTOM2 como control de crecimiento de la cepa parental) y por otro lado la cepa parental SFY87-GFP más el mutante *pho4*-dTOM2 en medio líquido YPD a 37°C de forma conjunta (cultivo mixto). Transcurridas las primeras 24 horas de crecimiento se diluyeron los cultivos nuevamente a una D.O. = 0.01 y se siguieron tanto los cultivos antiguos (línea continua) como los cultivos nuevos (líneas discontinuas) durante otras 24 horas para comprobar si la presencia de nuevos nutrientes afectaba al crecimiento.

El seguimiento de la D.O. de ambos cultivos mixtos muestra unas curvas de crecimiento similares creciendo ambos a la misma velocidad (Figura 78.A). Sin embargo, transcurridas las primeras 24 horas y tras la dilución del cultivo (líneas discontinuas), se

Resultados

puede observar como el cultivo que contiene el mutante *pho4* (cuadrados rojos) tiene una fase de latencia más corta y por tanto reanuda antes el crecimiento que el cultivo que solo contiene las cepas parentales (círculos verdes), aunque al final del ensayo alcanza los mismo valores que éste.

A la vez que se tomaban los datos de densidad óptica se tomaban muestras para su siembra en placa y posteriormente llevar a cabo el recuento de UFCs de las cepas por separado (Figura 78.B), para así poder calcular el valor del índice de adecuación biológica (*fitness*) del mutante *pho4* en comparación con la cepa parental. Observamos claras diferencias en el comportamiento de ambas cepas. El crecimiento del mutante *pho4* se ve desplazado por la cepa parental; este desplazamiento se aprecia ya a las dos horas de incubación hasta alcanzar un índice de adecuación biológica de 0.5 (*pho4*) transcurridas las primeras 24 horas y acabar casi por desaparecer transcurridas 48 horas. Además si diluimos el cultivo transcurridas las primeras 24 horas (líneas discontinuas) vemos como el mutante *pho4* no es capaz de recuperarse sino todo lo contrario termina casi por desaparecer en un tiempo más corto.

A la luz de los resultados obtenidos podemos concluir que el mutante *pho4* presenta defectos que le hacen ser menos competitivo tanto a la hora de crecer como de colonizar cuando se encuentra en competición con otras cepas de *C. albicans*.

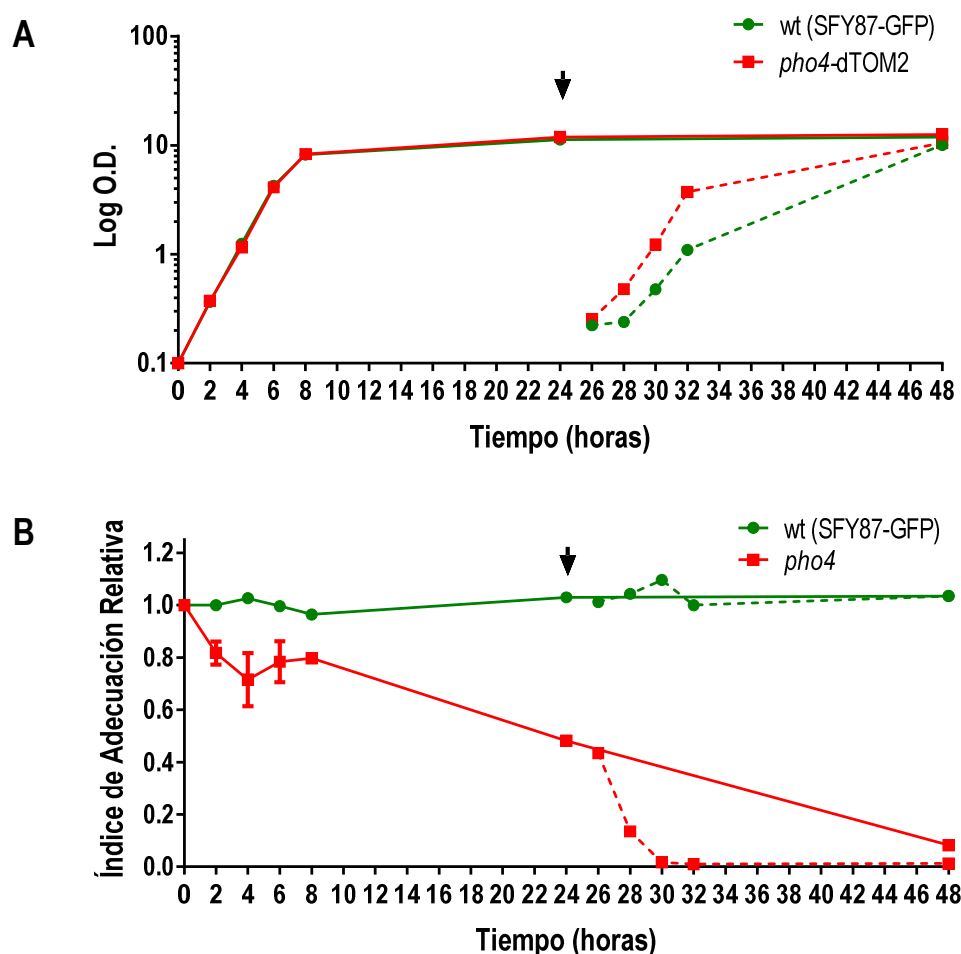


Figura 78. Crecimiento de cultivos mixtos de la cepa parental y del mutante *pho4*.

(A) Representación gráfica del crecimiento de los cultivos mixtos de la cepa silvestre SFY87-GFP y SFY87-dTOM2 (círculos verdes) y de la cepa silvestre SFY87-GFP y el mutante *pho4*-dTOM2 (cuadrados rojos) a lo largo del tiempo realizado mediante medida de D.O. (B) Índice de adecuación biológica relativa calculado como la división del porcentaje de adecuación biológica de las cepas entre su porcentaje en el inóculo inicial (los valores de SFY87-GFP fueron calculados con un cultivo control de SFY87-GFP y SFY87-dTOM2). En ambas gráficas la flecha negra indica cuando se diluyeron los cultivos y las líneas discontinuas el seguimiento de los cultivos diluidos. Se representa la media y la barra de la desviación estándar de tres experimentos independientes.

III. Sensibilidad a estrés nitrosativo del mutante *pho4* en competición

Como se ha descrito anteriormente el mutante *pho4* es más sensible a la presencia de GSNO que la cepa parental (Figura 48). A la luz de los resultados obtenidos en competición nos preguntamos si el comportamiento del mutante *pho4* en un cultivo mixto en presencia de estrés nitrosativo sería la misma.

Resultados

Por ello llevamos a cabo un estudio de viabilidad mediante recuento de UFCs frente a 0.6 mM de GSNO con un cultivo mixto de la cepa parental y el mutante *pho4* en comparación con un cultivo mixto de la cepa parental marcada con las dos proteínas fluorescentes. El resultado de dicho ensayo se representa como el índice relativo de viabilidad (Figura 79). En él se aprecia una pérdida de la viabilidad del mutante *pho4* a lo largo del tiempo, alcanzando los niveles más bajos tras 4 horas de incubación. Sin embargo la cepa silvestre mantiene niveles de viabilidad relativos constantes en el tiempo, es decir el marcaje (GFP o dTOM2) no tiene efecto en la sensibilidad al óxido nítrico generado por el GSNO. La diferencia de viabilidad del mutante *pho4* con la cepa parental es muy significativa ($P = 0.0006$ tras la realización de una ANOVA de dos vías) lo que indica que en un cultivo mixto el óxido nítrico tiene un efecto mucho mayor sobre la cepa carente de Pho4 que sobre la cepa parental.

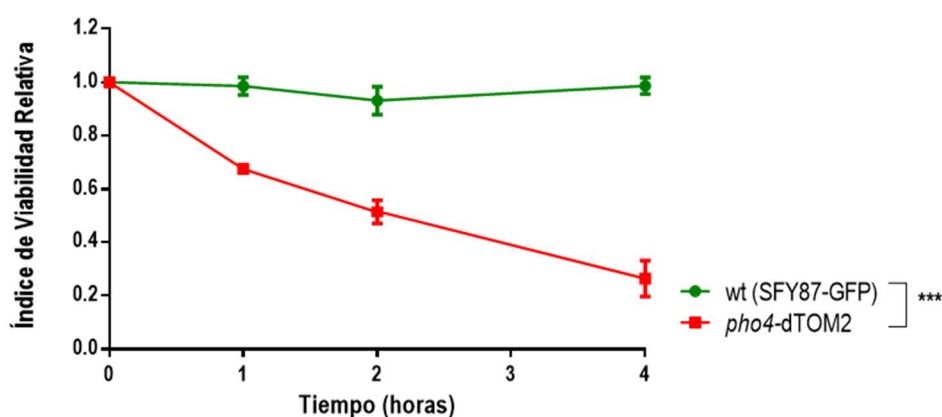


Figura 79. Viabilidad del mutante *pho4* frente a GSNO en un cultivo mixto.

Un cultivo mixto equilibrado de SFY87-GFP/SFY87-dTOM2 (círculos verdes) y de SFY87-GFP/*pho4*-dTOM2 (cuadrados rojos) crecido en medio YPD a 37°C fue sometido a 0.6 mM de GSNO durante 4 horas. Se recogieron muestras cada hora y se sembraron en placas de SD agar. Tras incubarse a 37°C durante 48 horas se efectuó el recuento de UFCs. Se calculó el índice relativo de viabilidad mediante la división del porcentaje de viabilidad de las cepas y su porcentaje en el inóculo inicial. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. (***) = $P < 0.001$.

G. Niveles de adhesión *ex vivo* de *sko1* y *pho4*

Uno de los principales factores de virulencia de *C. albicans* es su capacidad para adherirse a células epiteliales y endoteliales. Tras comprobar la resistencia a sales biliares de los mutantes *sko1* y *pho4* y de la incapacidad de colonizar en competición por parte del

mutante *pho4*, quisimos determinar la capacidad de adhesión a mucosas de ambos mutantes.

Realizamos ensayos de adhesión al lumen intestinal de ratones no colonizados. Para dichos ensayos empleamos mezclas equilibradas de la cepa parental (SFY87-GFP) y el mutante a ensayar (*pho4*-dTOM2 o *sko1*-dTOM2) que incubamos en contacto con el lumen intestinal obtenidos de ratones no colonizados por *C. albicans*. Se llevó a cabo un ensayo paralelo con una mezcla de la cepa parental marcada con las dos proteínas fluorescentes. El ensayo se realizó durante 150 minutos a 37°C para permitir la adhesión de las células de levadura al epitelio intestinal. Transcurrido ese tiempo y tras lavar para descartar las células no adheridas, se homogenizó dicha porción intestinal en PBS y se sembró en placas de SD.

Los resultados obtenidos de dichos ensayos (Figura 80) muestran que el mutante *sko1* con un índice de adhesión relativo del 0.89 posee una capacidad de adhesión similar a la cepa parental (0.96). Mientras que en el caso del mutante *pho4* dicho índice es de tan solo 0.57 lo que representa unas diferencias muy significativas ($P = 0.0002$) con respecto a la cepa parental.

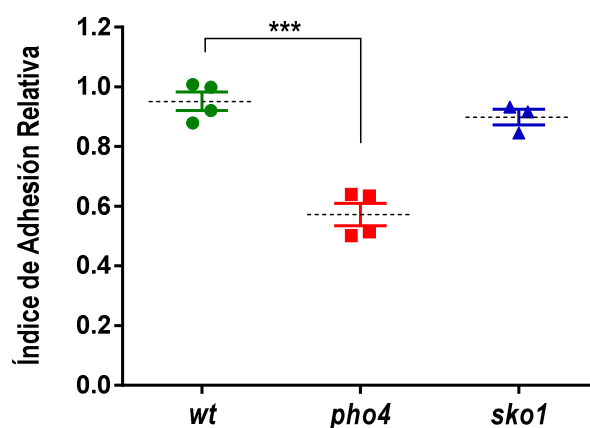


Figura 80. Adhesión de los mutantes *pho4* y *sko1* a la mucosa intestinal.

Niveles de adhesión de las cepas SFY87-GFP (wt, círculos verdes), *pho4*-dTOM2 (*pho4*, cuadrados rojos) y *sko1*-dTOM2 (*sko1*, triángulos azules). El índice relativo de adhesión se calculó mediante la división del porcentaje de adhesión a la mucosa intestinal de las cepas y su porcentaje en el inóculo inicial. Se representa cada valor independiente y la media con la desviación estándar de tres o cuatro experimentos independientes. (***) = $P < 0.001$.

Podemos concluir que el mutante *pho4* presenta una capacidad de adhesión al lumen intestinal de ratón significativamente inferior cuando se encuentra en un cultivo mixto. Esta menor capacidad de adhesión podría explicar la pérdida de este mutante en ensayos de

Resultados

colonización en competición. Por otro lado, el mutante *sko1* posee una capacidad de adhesión similar a la cepa silvestre lo que se correlaciona con su capacidad de establecerse como comensal en el tracto intestinal de ratón.

DISCUSIÓN

Los seres vivos han desarrollado mecanismos que les permiten percibir y responder a los cambios que se producen en el medio que les rodea y, de esta forma, adaptarse y sobrevivir a las nuevas condiciones ambientales. Como comensal, *C. albicans* se enfrenta a diversas condiciones fisiológicas que son reflejo de los distintos nichos en los que habita. Debe de ser capaz de adaptarse a ambientes con una alta osmolaridad como los que tienen lugar en la médula renal (Kwon *et al.*, 2009), así como a ambientes microaerófilos o anaeróbicos que se dan a lo largo del tracto gastrointestinal y hacer frente a las condiciones oxidantes provocadas durante la interacción con las células del sistema inmunológico del hospedador. Uno de los mecanismos esenciales para llevar a cabo esta adaptación es el llevado a cabo mediante rutas de transducción de señales mediadas por MAP quinasas. Se trata de rutas muy conservadas en eucariotas (Kultz, 1998) y que en hongos patógenos se han implicado en la biogénesis de la pared celular, en respuesta a estrés y en virulencia. Dada la importancia de estos mecanismos, nuestro laboratorio ha centrado su trabajo de los últimos años en el estudio de dichas rutas de señalización. Ello ha permitido la identificación y caracterización de distintos elementos de las mismas como Mkc1, Hog1, Sho1, Pbs2 y Opy2 (Herrero de Dios C. *et al.*, 2013; Arana *et al.*, 2005; Román *et al.*, 2005; Alonso-Monge *et al.*, 1999; Navarro-García *et al.*, 1995).

Los elementos identificados hasta el momento forman parte bien del módulo de MAP quinasas, de elementos transmembrana o por encima del módulo de MAPKs. En el trabajo de esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en la búsqueda, identificación y caracterización de factores de transcripción de *C. albicans* implicados en la respuesta a estrés oxidativo así como en el estudio del papel de éstos en la capacidad de interaccionar de *C. albicans* con el hospedador. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han permitido identificar a Sko1 como un factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés oxidativo en esta levadura, así como en la transición levadura-hifa. Igualmente, han definido el papel del factor de transcripción Pho4 en el metabolismo del fosfato y la respuesta a diferentes tipos de estrés.

1. Sko1 mediador de la respuesta a estrés y represor de la transición levadura-hifa

En *S. cerevisiae* se ha descrito que el factor de transcripción Sko1 está implicado en la transcripción de genes de respuesta tanto a estrés osmótico como oxidativo (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2001; Pascual-Ahuir *et al.*, 2001). Dada la similitud entre Sko1 en *S. cerevisiae* y en *C. albicans* y la conservación de los sitios de fosforilación por Hog1, nos planteamos que tuviese una función similar en esta levadura.

En *S. cerevisiae*, la adaptación a un ambiente hiperosmótico viene mediada por la fosforilación de Sko1 vía Hog1, Sko1 forma un complejo con otras proteínas reguladoras como Cyc8 y Tup1 que, junto con el complejo SAGA y Swi/Snf, actúa como represor o activador de la transcripción de genes de respuesta a estrés osmótico (Proft *et al.*, 2005; Proft and Struhl, 2002). Nuestros resultados, al igual que los obtenidos de forma simultánea a la elaboración de este trabajo por Rauceo y colaboradores (Rauceo *et al.*, 2008), muestran que en *C. albicans*, y al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, los mutantes *sko1* se ven ligeramente afectados en el crecimiento en presencia de cloruro sódico y sorbitol. Sin embargo, en el doble mutante *hog1 sko1* se aprecia una menor osmosensibilidad que en el mutante *hog1*, por lo que la delección de *SKO1* en un mutante *hog1* revierte parcialmente la susceptibilidad de este último a compuestos osmoestresantes. Este efecto es similar al descrito en *S. cerevisiae* (Proft and Serrano, 1999), la recuperación de la osmotolerancia se explica por la función represora de Sko1; en ausencia de Hog1, Sko1 no es fosforilado impidiendo la transcripción de genes de adaptación a estrés. Sin embargo, en el doble mutante *hog1 sko1*, no existe la función represora de Sko1 y la expresión basal de los genes de adaptación a estrés son suficientes para mejorar el crecimiento del mutante *hog1* en medios hiperosmolares. En *C. albicans* la función de Sko1 en respuesta a estrés osmótico podría ser similar a la descrita en *S. cerevisiae*. Además, Rauceo y colaboradores confirmaron que, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, Hog1 fosforila Sko1 en respuesta a estrés osmótico (Rauceo *et al.*, 2008). Otros estudios han demostrado la dependencia de Sko1 en la transcripción de genes que también son dependientes de Hog1 en respuesta a estrés osmótico (Marotta *et al.*, 2013) demostrando la relación entre Hog1 y Sko1 en *C. albicans*. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la expresión de *SKO1* en respuesta a estrés osmótico no depende de Hog1 pero sí de Sko1 lo que indica que no toda la respuesta transcripcional en respuesta a estrés osmótico

es vía Hog1. En este sentido, la ruta mediada por Cek1 también ha sido implicada en la adaptación a estrés osmótico (Herrero de Dios *et al.*, 2014). Aunque la relación entre Cek1 y Sko1 no ha sido analizada la cuantificación de la expresión de Cek1 en salida de fase estacionaria ha demostrado que ésta depende de Hog1 y Sko1. Por tanto, nuestros datos parecen indicar que la función de Sko1 en presencia de estrés osmótico es similar a la de *S. cerevisiae*, actuando como represor, en estado basal o ausencia de fosforilación, y como activador de diferentes genes involucrados en la adaptación a estrés osmótico (Figura 81). Además existe una relación Hog1-Sko1 y Cek1 a nivel transcripcional.

Debido a su condición de patógeno oportunista *C. albicans* debe hacer frente al estrés oxidativo generado por las ROS producidas por el contacto con las células del sistema inmunitario del hospedador. Es principalmente a través de la ruta mediada por la MAP quinasa Hog1 como *C. albicans* percibe, señala y es capaz de responder y sobrevivir a las condiciones oxidantes del medio. Hasta ahora no se han descrito factores de transcripción involucrados en esta respuesta que sean dependientes de estas rutas. El factor de transcripción Cap1 y la proteína reguladora Skn7 son proteínas implicadas en la respuesta a agentes oxidantes; sin embargo, no parecen estar directamente relacionadas con Hog1. Ensayos realizados con anterioridad a esta tesis en nuestro grupo muestran que la delección de *CAP1* no afecta al patrón de fosforilación de Hog1, así como la delección de *HOG1* no altera la localización nuclear de Cap1 en respuesta a estrés oxidativo (Alonso-Monge *et al.*, 2003).

Nuestros datos indican que Sko1 está implicado en la respuesta a estrés oxidativo al igual que ocurre con su homólogo en *S. cerevisiae* (Rep *et al.*, 2001). La delección de *SKO1* afecta de manera distinta al crecimiento de las células en función del agente oxidante ensayado. En presencia de peróxido de hidrógeno y de manera similar a lo que sucede en *S. cerevisiae*, los mutantes *sko1* tienen una ligera sensibilidad a éste, mientras que el doble mutante *hog1 sko1* revierte parcialmente la sensibilidad del mutante *hog1*. No obstante, en presencia de menadiona y a pesar de que la delección de *SKO1* afecta al crecimiento celular, en el doble mutante no se revierte la susceptibilidad a dicho compuesto.

Aunque nuestros datos no demuestran una relación directa entre Hog1 y Sko1, la delección de *SKO1* sí afecta al patrón de fosforilación de Hog1. Los niveles inferiores de fosforilación de Hog1 parecen indicar que Sko1 actúa como un regulador positivo de la

activación de Hog1 en respuesta a peróxido de hidrógeno. Esto podría deberse a que Sko1 actúe como represor de genes que codifican enzimas protectoras frente un estado pro-oxidante celular en condiciones basales de crecimiento. Esta función represora se ha demostrado en el estudio transcripcional de mutantes *sko1* en condiciones estándar de crecimiento (Alonso-Monge *et al.*, 2010), donde distintos genes de respuesta a estrés están sobreexpresados. La ausencia de Sko1, en el mutante *hog1*, podría inducir la expresión de genes (por ausencia de represión) propios de respuesta a estrés oxidativo y por tanto, cuando se adiciona peróxido de hidrógeno la activación de Hog1 es menor que la que cabría esperar si no tuviera un ambiente antioxidante intracelular. Algo similar se observa en mutantes *trx1* (los cuales presentan niveles de fosforilación de Hog1 menores en respuesta a peróxido de hidrógeno) (da Silva *et al.*, 2010). Trx1 juega un importante papel tanto por su actividad antioxidante como por su función de coordinación de la respuesta frente a ROS a través de distintas rutas de señalización.

El estudio transcripcional en respuesta a peróxido de hidrógeno del mutante *sko1* ha demostrado que la mayor parte de los genes que se inducen en la cepa parental lo hacen también en el mutante *sko1* (116 de los 119 inducidos en la cepa parental o de los 137 inducidos en el mutante *sko1*), lo que parece indicar que buena parte de los genes de respuesta a peróxido de hidrógeno son controlados por mecanismos ajenos a Sko1. A una conclusión similar llegaron Enjalbert y colaboradores al realizar estudios transcripcionales en mutantes *hog1* de *C. albicans* (Enjalbert *et al.*, 2006). Este grupo analizó el patrón transcripcional en respuesta a estrés osmótico (0.5 M NaCl), oxidativo (5 mM H₂O₂) y estrés a metales (0.5 mM CdSO₄). Hog1 controla casi completamente la respuesta transcripcional a estrés osmótico y metales pero no la respuesta a estrés oxidativo. La comparación de la respuesta transcripcional de Hog1 con nuestros datos sugiere que la respuesta a peróxido de hidrógeno es, en gran medida, independiente de Hog1 y de Sko1 (Figura 22). Otro de los mecanismos implicados en la respuesta frente a peróxido de hidrógeno es el mediado por Mkc1. El hecho de que la ausencia de Sko1 afecte al patrón de fosforilación de Mkc1 sugiere que, al igual que en el caso de Hog1, existe una regulación positiva por parte de Sko1 sobre Mkc1. Dicha regulación parece ser dependiente de la concentración y tiempo de exposición frente al peróxido de hidrógeno. Esta regulación podría tener lugar de manera indirecta, ya que en ausencia de Sko1 se activan genes de respuesta a estrés térmico, oxidativo y metabólico. Las proteínas codificadas por estos genes pueden modificar o tener

un efecto en el metabolismo basal de la célula, lo que explicaría la diferente fosforilación de Hog1 y Mkc1 así como el diferente efecto de los agentes oxidantes.

La ausencia de Sko1 conlleva una menor tolerancia frente a ciertos compuestos oxidantes *in vitro* (menadiona) pero no implica una menor viabilidad en los ensayos realizados *ex vivo* con la línea celular HL-60 ni una menor virulencia en el modelo de *G. mellonella*. Tampoco existen diferencias significativas en la adecuación biológica (*fitness*) en un modelo de comensalismo en ratón (Alonso-Monge *et al.*, 2010). Estos resultados están de acuerdo con la ausencia de fenotipos drásticos *in vitro*. Por el contrario, en el doble mutante *hog1 sko1* observamos una mayor susceptibilidad a la línea celular HL-60 que la presentada por los mutantes sencillos, lo que parece indicar que Sko1 está, de alguna manera, implicado en la respuesta generada por este tipo de célula fagocítica. Sin embargo, la mayor sensibilidad presentada por el doble mutante en los ensayos *in vitro* y *ex vivo* (Alonso-Monge *et al.*, 2010) no se correlaciona con una menor capacidad de virulencia en el modelo de supervivencia en *G. mellonella*, ya que el doble mutante *hog1 sko1* se comporta como la cepa silvestre o el mutante *sko1* al contrario de lo que sucede con el mutante *hog1*. Esto puede deberse a que las concentraciones de agentes estresantes empleadas en los ensayos *in vitro* son mucho mayores que las que realmente tienen lugar en los ensayos *ex vivo* e *in vivo*, tal y como ya describieran Arana y colaboradores (Arana *et al.*, 2007). También podría deberse al hecho de que los modelos empleados tanto *in vivo* como *ex vivo* son más complejos, pudiendo intervenir de manera simultánea diversas especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno y actividades enzimáticas diversas.

Por lo tanto, la señalización y respuesta global frente al estrés oxidativo es muy compleja, dependiendo del agente oxidante así como de la concentración del mismo. Nuestros datos indican que (1) la respuesta es mediada tanto por la ruta de respuesta a estrés (Hog1) como por la ruta de integridad celular (Mkc1) y, (2) Sko1 ejerce un papel tanto de represor como de inductor de genes de respuesta a estrés oxidativo. Además, la respuesta ejercida por Sko1 debe tener lugar de forma simultánea a la ejercida por otros factores de transcripción como Cap1 y Skn7.

En *S. cerevisiae*, Sko1 es regulado por fosforilación tanto por la ruta HOG como por la ruta cAMP/PKA (Rep *et al.*, 2001; Pascual-Ahuir *et al.*, 2001), y ambas rutas en *C. albicans*

se han relacionado con la regulación de la transición levadura-hifa (Bockmuhl *et al.*, 2001; Alonso-Monge *et al.*, 1999). CaSko1 parece conservar los tres sitios consenso de fosforilación por Hog1 así como uno de los tres sitios de fosforilación por PKA, lo que sugiere una relación de estas rutas con Sko1 y un posible papel de éste en la morfogénesis de *C. albicans*.

La regulación de la transición levadura-hifa en *C. albicans* es muy compleja, ya que en ella están implicadas distintas rutas de señalización y factores de transcripción (Gow *et al.*, 2012). Se ha descrito la implicación de Hog1 como represor de la filamentación en *C. albicans*, hecho que se demuestra por la alta capacidad de filamentación por parte del mutante *hog1* incluso en condiciones subinductoras (concentraciones limitantes de suero o baja temperatura (Alonso-Monge *et al.*, 1999)). Hasta ahora no se ha identificado ningún factor de transcripción que sea dependiente de Hog1 en esta respuesta. Los datos obtenidos de nuestros ensayos de filamentación y morfogénesis muestran una mayor capacidad de filamentación e invasión por parte del mutante *sko1*, lo que indica un papel represor por parte de Sko1 en la transición levadura-hifa de *C. albicans*. Los análisis de la respuesta transcripcional en mutantes *sko1* han corroborado los resultados obtenidos *in vitro*, ya que en éstos se encuentran inducidos genes relacionados con el crecimiento filamentoso y de la pared celular de la hifa. El hecho de que el doble mutante *hog1 sko1* sea hiperfilamentoso incluso en condiciones subinductoras, y que Sko1 conserve los sitios de fosforilación de Hog1 hace pensar en una posible dependencia entre Hog1 y Sko1 durante el desarrollo hifal o bien que ambos son represores pero actúan de forma independiente. En el estudio transcriptómico realizado por Enjalbert en un mutante *hog1* aparecieron inducidos dos genes relacionados con la transición levadura-hifa, *ECE1* y *HWP1* (Enjalbert *et al.*, 2006). Nosotros cuantificamos la expresión de estos genes observando que la delección de *HOG1* inducía la expresión de ambos genes en condiciones tanto inductoras como subinductoras de la transición levadura-hifa (37°C y 30°C), mientras que el mutante *sko1* solo lo hacía en condiciones inductoras (37°C). Además, el doble mutante muestra una inducción mayor que los mutantes sencillos y en ambas temperaturas. Este comportamiento diferencial sugiere que a pesar de que Hog1 y Sko1 actúan como represores de la transición levadura-hifa, estos actúan de forma paralela e independiente.

Se sabe que Efg1 y Flo8 son factores de transcripción implicados en la transición levadura-hifa, interactuando de manera conjunta en la expresión de genes específicos de la

hifa y ambos son dependientes de la ruta PKA en *C. albicans* (Cao *et al.*, 2006; Tebarth *et al.*, 2003). Para intentar relacionar la ruta PKA con Sko1 sobreexpresamos la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, Tpk2, implicada en la transición morfogénica y cuyos mutantes *tpk2* son incapaces de filamentar e invadir en medio sólido. La sobreexpresión de *TPK2* provocaba filamentación e invasión tanto en la cepa parental como en el mutante *sko1*. Estos resultados parecen indicar que la filamentación inducida por la sobreexpresión de *TPK2* no depende de Sko1 y, por ello, la función represora del factor de transcripción Sko1 puede ser independiente de la ruta PKA.

Trabajos anteriores de nuestro grupo han relacionado Hog1 con la biogénesis de la pared celular de *C. albicans* al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, ya que se ha descrito como los mutantes *hog1* presentan una mayor resistencia frente a compuestos que alteran su estructura (Alonso-Monge *et al.*, 1999). De forma simultánea a Rauceo (2008), nuestros datos muestran cómo la delección de *SKO1* conlleva defectos en la pared celular, ya que la ausencia de Sko1 afecta al crecimiento en presencia de rojo Congo, blanco de calcoflúor y caspofungina. Sin embargo, de nuevo, esta función de Sko1 es independiente de Hog1, ya que como pudimos observar el doble mutante *hog1 sko1* presenta un fenotipo intermedio, mostrando mayor sensibilidad que el mutante *hog1*. Diversos estudios con mutantes en elementos de la ruta HOG como *pbs2* y *hog1*, han mostrado que estos presentan una mayor resistencia a compuestos que alteran la pared celular y además exhiben niveles altos de fosforilación de Cek1, aunque esta relación entre la ruta HOG y la ruta mediada por Cek1 no está clara. Sin embargo, parece ser que esta relación no es a través de Sko1, ya que la ausencia de este factor no disminuye los niveles de fosforilación de Cek1, por lo que esta hiperfosforilación es dependiente de Hog1 pero no de Sko1. No obstante, la respuesta transcripcional de *CEK1* sí es dependiente tanto de Hog1 como de Sko1, ya que la expresión de *CEK1* durante la salida de fase estacionaria disminuye tanto en un mutante *hog1* como en un mutante *sko1* pero no el doble mutante.

C. albicans es un patógeno oportunista capaz de habitar diferentes nichos en el hospedador entre ellos el tracto digestivo. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de comensalismo que permite estudiar la capacidad de *C. albicans* de establecerse como comensal en el tracto gastrointestinal de ratón (Prieto *et al.*, 2014). Se ha descrito cómo la ruta HOG es esencial para la colonización del intestino de ratón, ya que los

mutantes en elementos de esta ruta son incapaces de colonizar y mantenerse en el intestino murino (Prieto *et al.*, 2014). Nosotros hemos observado que *Sko1* es prescindible para el establecimiento de *C. albicans* en el tracto gastrointestinal como comensal. El mutante *sko1* es capaz de establecerse y mantenerse en unos niveles similares a los de la cepa silvestre. Sin embargo, el doble mutante *hog1 sko1* es capaz de colonizar y establecerse aunque con el tiempo se acaba perdiendo. El periodo que el doble mutante *hog1 sko1* es capaz de mantenerse en el intestino murino es significativamente más prolongado que el descrito para el mutante sencillo *hog1*. Este fenotipo se asemeja al observado en el modelo de infección sistémica en *G. mellonella* donde el doble mutante *hog1 sko1* es más virulento que el mutante *hog1* y al comportamiento observado en presencia de estrés osmótico o peróxido de hidrógeno por parte del doble mutante *hog1 sko1*. Estos resultados pueden deberse a la función represora de *Sko1* y a su dependencia de *Hog1*. *Hog1* es importante para responder a estrés; los mutantes *hog1* manifiestan una mayor susceptibilidad a diversos agentes estresantes, debido a su incapacidad para responder y adaptarse a las condiciones generadas por éstos. En ausencia de *Sko1*, diferentes genes protectores frente a estrés se encuentran sobreexpresados y, el mutante muestra una ligera sensibilidad o ésta no se detecta en presencia de agentes osmoestresantes y oxidantes. Por su parte el doble mutante *hog1 sko1* aunque carece de la capacidad de respuesta, tiene sobreexpresados genes protectores, lo que suaviza ciertos fenotipos observados en el mutante *hog1*. Si bien es cierto, que para el establecimiento como comensal *C. albicans* debe enfrentarse a condiciones características del tracto gastrointestinal. Uno de ellos es la presencia de sales biliares que con su acción detergente podrían dañar la pared de la levadura, en este caso observamos un comportamiento diferencial del mutante *sko1* y el doble mutante, siendo el primero resistente y el segundo no, lo que indica que la respuesta a sales biliares es dependiente de *Hog1*, ya que el mutante *hog1* es sensible (Prieto *et al.*, 2014), y no de *Sko1*. Otro factor que podría afectar al establecimiento serían las condiciones ambientales que se dan a lo largo del tracto gastrointestinal. Sin embargo, no observamos diferencias de crecimiento entre las cepas tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Como describimos en la introducción, la adhesión es uno de los principales factores de virulencia de *C. albicans* y paso esencial en el establecimiento como comensal. Nuestros datos muestran como la ausencia de *SKO1* no afecta a la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal de ratón en un modelo de competición, junto con la resistencia a sales biliares explicaría por qué el mutante *sko1* es capaz de establecerse en el intestino, al

contrario de lo que sucede con el mutante *hog1* que tiene la capacidad de adhesión afectada y no es capaz de colonizar. Estos datos estarían de acuerdo con los datos obtenidos en virulencia al ser Sko1 prescindible para la virulencia en los modelos de infección en ratón y en *G. mellonella*.

A pesar de que Sko1 no parece jugar un papel relevante en la virulencia de esta levadura, sí parece serlo en otros aspectos esenciales de su biología. Nuestro trabajo indica que Sko1 tiene diferentes funciones: (1) en medios hiperosmóticos actúa regulando distintos genes involucrados en la adaptación a este estrés (como los que permiten la acumulación de glicerol); (2) en respuesta a estrés oxidativo, actúa principalmente como inductor transcripcional, colaborando con Cap1 y la ruta Mkc1, probablemente bajo el control de Hog1; (3) en respuesta a daños en la pared celular, Sko1 induce la transcripción de genes implicados en su reparación, si bien por un mecanismo independiente de la ruta HOG; (4) Sko1 actúa, finalmente, como represor de la transición levadura-hifa, actuando de manera independiente a las rutas PKA y la ruta mediada por Hog1 (Figura 81).

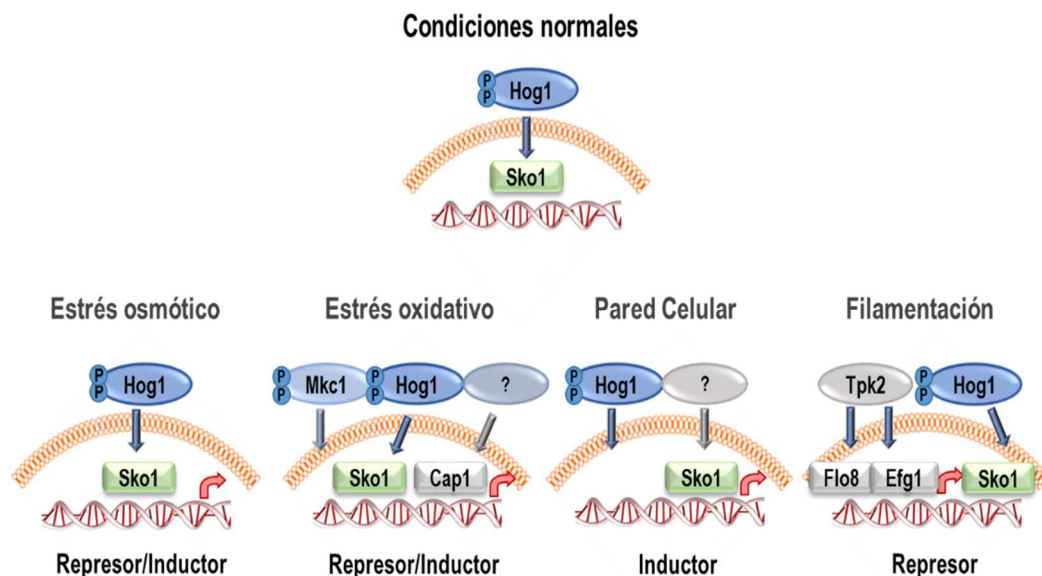


Figura 81. Modelo de los papeles desempeñados por el factor de transcripción Sko1 en *C. albicans*.

En condiciones normales de crecimiento, el factor de transcripción Sko1 actúa como represor de la transcripción de genes involucrados en virulencia y filamentación. Sin embargo, en función de las condiciones ambientales el factor de transcripción actúa como represor o inductor de genes que van a permitir su adaptación a las nuevas condiciones.

2. Pho4, un factor de transcripción implicado en el metabolismo oxidativo de *C. albicans*

Para la identificación de elementos importantes en la respuesta transcripcional a estrés hemos empleado una colección de mutantes en factores de transcripción. Esta colección fue sometida a diferentes tipos de estrés y condiciones ambientales con el fin de identificar aquellos factores de transcripción implicados en cada uno de los procesos/respuestas analizados, de forma similar al desarrollado por Homann y colaboradores (Homann *et al.*, 2009). Sin embargo, nosotros hemos centrado nuestra búsqueda en la susceptibilidad de dichos mutantes frente a agentes osmoestresantes (NaCl y Sorbitol) y oxidativos (en los que se incluían distintas concentraciones de peróxidos y menadiona así como agentes oxidantes como la diamida). A pesar de que esta búsqueda no fue muy sensible (de hecho no apareció Sko1), sí nos ha permitido la identificación de 11 mutantes en factores de transcripción que muestran fenotipos de sensibilidad frente a algunos de los agentes oxidantes empleados. De ellos, tan solo Cap1 y Skn7 habían sido previamente implicados en este tipo de respuesta (Dantas *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2004; Alarco and Raymond, 1999). De entre los mutantes con fenotipos de sensibilidad se eligió el mutante *pho4* para profundizar más en su estudio, ya que era el que mostraba fenotipos de sensibilidad a un mayor número de compuestos generadores de estrés oxidativo u osmótico.

En *S. cerevisiae* Pho4 (ScPho4) está implicado en la respuesta transcripcional a fosfato formando parte de la ruta PHO. CaPho4 es una proteína conservada dentro del mundo de las levaduras, existiendo homólogos en *S. cerevisiae*, *C. glabrata* y *Neurospora crassa* (Komeili and O'Shea, 1999b; Kerwin and Wykoff, 2009; Kang and Metzenberg, 1990). ScPho4 actúa en ausencia de fosfato como inductor de genes que codifican fosfatasas (Pho5) y transportadores de alta afinidad para el fosfato (Pho84 y Pho89) con el fin de aumentar la concentración intracelular de fosfato. En *S. cerevisiae* Pho4 junto con Pho2 se encuentra en el núcleo en ausencia de fosfato permitiendo la transcripción de genes. No obstante, en altas concentraciones de fosfato, Pho4 es hiperfosforilado por el complejo Pho80/Pho85, lo que permite su salida al citoplasma. CaPho4 podría comportarse de forma similar, ya que parece conservar los motivos de fosforilación presentes en *S. cerevisiae*. Además, nuestros ensayos de movilidad electroforética muestran como Pho4 es fosforilado

al pasar de un medio carente de fosfato a un medio con altas concentraciones de fosfato (Figura 82), por lo que CaPho4 podría ser responsable de la inhibición de la transcripción de genes que faciliten la entrada de fosfato en la célula.

Nosotros hemos comprobado como en *C. albicans* Pho4, además de estar implicado en la respuesta a bajas concentraciones de fosfato, también es esencial para la respuesta a diferentes tipos de estrés. Nuestros datos muestran como la delección de *PHO4* afecta al crecimiento en medios con altas concentraciones de compuestos osmoestresantes, oxidantes e incluso generadores de estrés nitrosativo, ya que esta susceptibilidad se ve complementada cuando sobreexpresamos una copia ectópica del gen *PHO4*. Pho4 es fosforilado en respuesta a estrés osmótico (NaCl); sin embargo, en respuesta a estrés oxidativo, la respuesta es diferente en función del agente oxidante. En presencia de peróxido de hidrógeno disminuye el tamaño en ensayos de movilidad electroforética lo que correspondería con una desfosforilación de Pho4, mientras que en presencia de menadiona no hemos observado ningún cambio de movilidad electroforética. En *S. cerevisiae* ScPho4 presenta cinco sitios de fosforilación que regulan la actividad de Pho4; dos de ellos promueven su exportación del núcleo mediante su unión a Msn5 y la fosforilación de un tercero inhibe su importación al núcleo, mientras que la fosforilación del residuo 223 impide su interacción con el factor de transcripción Pho2 (Komeili and O'Shea, 1999b). Las diferencias en fosforilación de CaPho4 en las distintas condiciones ambientales pueden ser debidas a que la proteína posee ocho posibles residuos de fosforilación, pudiendo ser cada uno de ellos responsable de que Pho4 active o inhiba la transcripción de genes de respuesta a esas condiciones (Figura 82).

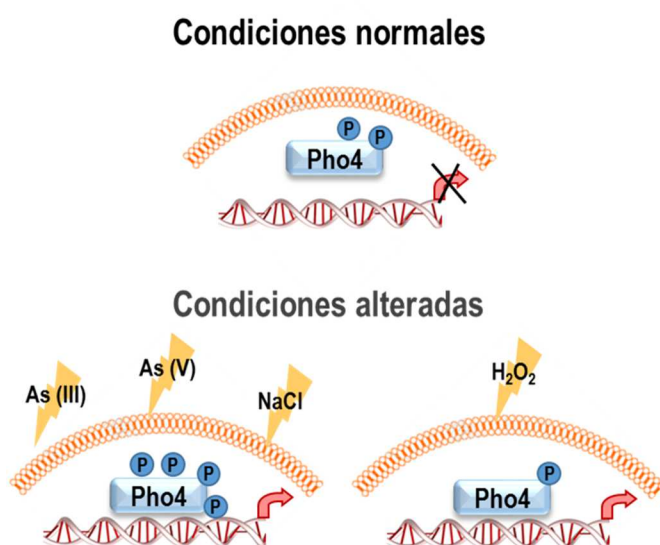


Figura 82. Modelo de la actuación del factor de transcripción Pho4 en *C. albicans*.

En condiciones normales de crecimiento Pho4 se encuentra fosforilado. Cuando en el medio hay altas concentraciones de arseniato, arsenito o cloruro sódico, Pho4 se fosforila (probablemente en otros residuos) activando la transcripción de genes de tolerancia a estos compuestos. Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno se desfosforila en alguno de los residuos para así posiblemente activar la transcripción.

Además, tanto la delección de *PHO4* como la sobreexpresión de *PHO4* alteran el patrón de fosforilación de las MAP quinasas en condiciones basales de crecimiento y en respuesta a distintos tipos de estrés. Este resultado sugiere la conexión entre el metabolismo del fosfato y la señalización vía MAP quinasas, bien de tipo directo (mediante la fosforilación de Pho4) o bien indirecta.

¿Por qué hemos estudiado el arsénico en *C. albicans* si esta levadura no es un microorganismo ambiental? En primer lugar, el arsénico se encuentra ampliamente distribuido por la naturaleza y diversos ensayos han mostrado como la microbiota del tracto gastrointestinal modifica el metabolismo del arsénico, generando distintos compuestos intermedios que son más o menos tóxicos que el propio arsénico (Lu *et al.*, 2014b; Lu *et al.*, 2013) e incluso como la propia ingesta de arsénico hace variar la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal (Potera, 2014; Pinyayev *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2014a). En segundo lugar, debido a que Pho4 es un factor de transcripción implicado en la respuesta al crecimiento en condiciones de bajo fosfato y debido a la analogía estructural del arseniato con el fosfato cabría esperar una implicación de Pho4 en la respuesta a éste. Por último, la ruta HOG está implicada en la señalización tanto de estrés como de la presencia de metales en el medio (Enjalbert *et al.*, 2006; Alonso-Monge *et al.*, 2003). En este trabajo hemos demostrado que los dos estados de oxidación más frecuentes del arsénico en la naturaleza, como son el arseniato y el arsenito, son agentes oxidantes en *C. albicans*, ya que hasta

ahora solo se había demostrado que el arsenito producía ROS en células de mamífero y en *S. cerevisiae* (Menezes *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2001).

En *S. cerevisiae* la presencia de arseniato en el medio es señalizada mediante la fosforilación de la MAP quinasa Slf2, perteneciente a la ruta de integridad celular. Los mutantes en elementos de esta ruta son susceptibles a arseniato presentando defectos del crecimiento en medios con este compuesto (Matia-Gonzalez and Rodriguez-Gabriel, 2011). En la levadura de fisión *S. pombe* la respuesta frente a arseniato ocurre a través de la ruta mediada por la MAPK Spc1/Sty1 (análogo de Hog1) (Salgado *et al.*, 2012). Sin embargo, en *C. albicans*, el arseniato desencadena la fosforilación de Hog1 y Mkc1, lo que podría indicar una colaboración de ambas rutas en la señalización y respuesta. Sorprendentemente, ninguno de los mutantes en elementos de estas rutas es susceptible a este compuesto. Este último hecho se asemeja a lo que sucede en la respuesta a peróxido de hidrógeno donde Mkc1 es fosforilada pero los mutantes *mkc1* no muestran sensibilidad a este compuesto (Navarro-García *et al.*, 2005). Así pues, estos resultados parecen indicar que ambas rutas están implicadas en la señalización. Pero, ¿es *C. albicans* capaz de diferenciar el fosfato del arseniato si ambos son análogos estructurales? Nuestros resultados muestran como *C. albicans* es capaz de diferenciar ambos aniones, ya que es capaz de señalar de manera diferente ambos compuestos y, además, ésta es dependiente de la presencia/ausencia de fosfato en el medio. Cuando en el medio hay arseniato y fosfato se fosforilan tanto Hog1 como Mkc1; sin embargo, ninguna de estas quinastas es fosforilada cuando en el medio solo hay arseniato. Esto podría deberse a que en ausencia de fosfato la respuesta transcripcional de la célula esté implicada en la captación y aumento del fosfato intracelular mediante transportadores de alta afinidad (Pho84) y fosfatases. En estas condiciones, *C. albicans* no captaría arseniato sino que sería capaz de distinguirlo del fosfato. Cuando tras incubar las células en un medio con bajo fosfato, lo suplementamos con fosfato, se produce la activación de Hog1 y Cek1. El hecho de que Cek1 se fosforile al añadir fosfato al medio tras un periodo de ayuno del mismo podría relacionarse con un crecimiento activo. Trabajos anteriores han demostrado que Cek1 se activa en distintas condiciones que requieren un crecimiento activo o reanudación de crecimiento en *C. albicans* (Román *et al.*, 2005). La ausencia de fosforilación de Cek1 en ausencia de fosfato refuerza esta hipótesis. La fosforilación de Hog1 se relaciona con una respuesta a estrés pero Hog1 también regula el metabolismo oxidativo. Así, la presencia de fosfato tras un periodo de ayuno podría ser una señal para *C. albicans* para activar el metabolismo que

le permita reactivar el crecimiento. Enjalbert observó que los niveles de expresión del transportador de alta afinidad de fosfato, Pho84, son dependientes de Hog1, ya que en condiciones basales de crecimiento en un mutante *hog1* su expresión se encuentra reprimida (Enjalbert *et al.*, 2006). El hecho de que la expresión de éste transportador de fosfato sea dependiente de Hog1, y que su homólogo en *S. cerevisiae* sea dependiente del factor de transcripción Pho4, sugiere que en *C. albicans* existe una posible relación entre Pho4 y Hog1 en respuesta a arseniato. En principio, nuestros resultados muestran como Pho4 es esencial para la tolerancia a arseniato en *C. albicans*. Además, y de manera similar a lo que ocurre al añadir fosfato a cultivos deplecionados en este compuesto (o cuando adicionamos cloruro sódico al medio) en presencia de arseniato, Pho4 es fosforilado o, al menos, se produce un retraso electroforético. Esta posible fosforilación puede ocurrir en sitios distintos a los que se fosforilan en ausencia de fosfato. Si esto es así, Pho4 actuaría de manera distinta en presencia de arseniato a como lo hace en presencia de fosfato, regulando la transcripción de genes específicos en cada circunstancia. Nosotros hemos detectado una inducción en los niveles de expresión de *PHO4* en respuesta a arseniato, más acusada y permanente en el tiempo cuando no hay fosfato en el medio. Por el contrario, no se detecta un aumento en la expresión de *PHO4* en respuesta a fosfato. La inducción de la expresión de *PHO4* en presencia de arseniato también podría ser un efecto secundario al intento de la célula de introducir fosfato para su metabolismo y, por el contrario, introduce más arseniato. Este incremento en los niveles de expresión de *PHO4* podría ser un mecanismo de salvamento de la célula para aumentar la transcripción de transportadores de alta afinidad y así evitar la entrada del arseniato.

Ahora bien, ¿es igual la señalización frente a arsenito? El arsenito puede entrar como tal en la célula a través de las aquaglicerolporinas, como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Wysocki *et al.*, 2001) o en *E. coli* (Sanders *et al.*, 1997), o bien a partir del arseniato el cual una vez dentro de la célula es reducido a arsenito por arseniato reductasas (Salgado *et al.*, 2012; Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Como dijimos anteriormente, el arsenito es capaz de producir ROS, por lo que bien la ruta mediada por Hog1 o la ruta mediada por Mkc1 pueden encargarse de su señalización. Sin embargo, solo los mutantes en elementos de la ruta HOG los que presentan una mayor susceptibilidad a este compuesto. En respuesta a peróxido de hidrógeno la señalización a Hog1 es a través de Ssk1 (Chauhan *et al.*, 2003), mientras que nuestros resultados con arsenito indican que la fosforilación de Hog1 es independiente de la vía Ssk1. En respuesta a arsenito nosotros observamos que la

activación de Hog1 es dependiente de Ssk2, ya que en un mutante *ssk1* sí que hay fosforilación de Hog1, mientras que en un mutante *ssk2* y en un mutante *pbs2* no se detecta dicha fosforilación de Hog1. Además, la señalización también es independiente de los elementos Sho1, Msb2 y Opy2, los cuales están involucrados en la fosforilación de Cek1 en respuesta a estrés de pared celular o en salida de fase estacionaria. Ello sugiere que la señal llega a Ssk2 directamente bien por señales intracelulares (el arsenito se encuentra ya dentro de la célula) o bien porque sea percibido fuera de la célula a través de un sensor por determinar que lleve la señal a Ssk2 a través de elementos distintos a Ssk1 (Figura 83). Esto sugiere la existencia de una vía alternativa para la fosforilación de Hog1, de manera similar a como ocurre en *S. cerevisiae*, donde en respuesta a estrés osmótico la activación de Ssk2 es independiente de Ssk1 (Zhi *et al.*, 2013).

A la vista de que la señalización en *C. albicans* tanto del arseniato como del arsenito es a través de la ruta HOG, de que el arsenito es capaz de producir ROS y que dentro de la célula (de mamíferos y otros microorganismos (Rosen, 2002)) el arseniato se reduce a arsenito, parece lógico pensar que la respuesta transcripcional puede ser llevada a cabo por el mismo factor de transcripción que en el caso del arseniato. En *S. cerevisiae*, se ha descrito que el factor de transcripción Yap1 (cuyo homólogo en *C. albicans* es Cap1) es el que se encarga de la tolerancia frente a arsenito (Thorsen *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros datos sugieren que Pho4 también está implicado en la tolerancia al arsenito ya que, al igual que en el caso del arseniato, también es fosforilado en presencia de éste. No obstante, la expresión de *PHO4* no se induce en presencia de arsenito, al contrario de lo que sucedía en el caso del arseniato. Por lo tanto, *C. albicans* es capaz de diferenciar entre fosfato, arseniato y arsenito, ya que usan distintas rutas y distintos elementos de señalización siendo capaz de responder y hacer frente a estos compuestos. Pho4 está implicado en la respuesta a estos tres compuestos siendo probablemente fosforilado en distintos residuos o interaccionando con distintos elementos, lo que le permite activar o reprimir la transcripción de diferentes genes en función del estímulo percibido.

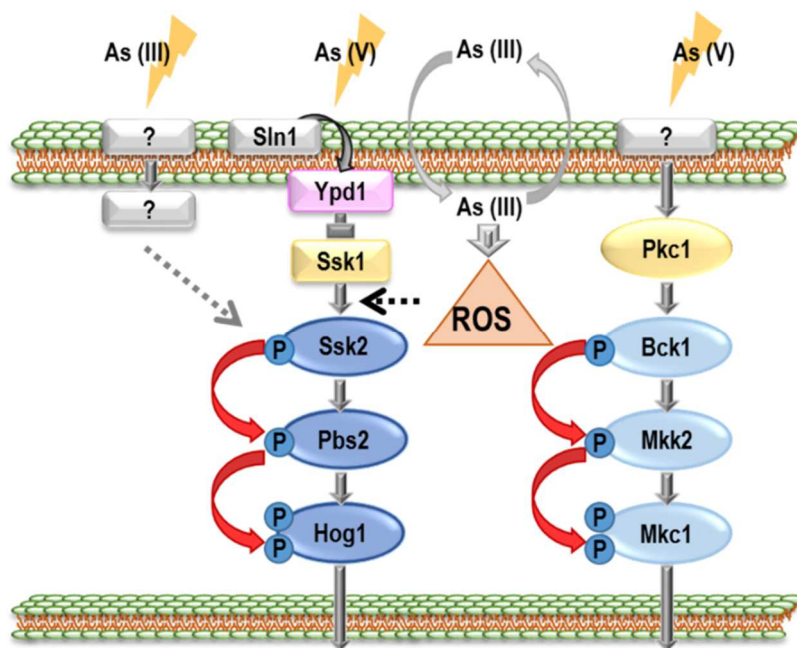


Figura 83. Representación esquemática de la señalización de la presencia de arseniato y arsenito.

En respuesta a arseniato (As (V)) se produce la fosforilación tanto de la ruta mediada por Hog1 como de la mediada por Mkc1, que regularían la respuesta transcripcional de genes involucrados en la detoxificación o tolerancia a arseniato. Respecto al arsenito (As (III)), la señalización es a través de la ruta HOG, sin embargo esta no implica a Ssk1. La señal del arsenito extracelular puede ser a través de un elemento hasta el momento desconocido, o una vez dentro de la célula, señalizar directamente en el módulo de las MAP quinasas.

Es sorprendente *a priori*, que a pesar de la susceptibilidad mostrada por el mutante *pho4* a todos los tipos de estrés analizados, no muestre diferencias en los ensayos *ex vivo* con macrófagos peritoneales de ratón ni *in vivo* en un modelo de virulencia en invertebrados como *G. mellonella* (este trabajo) o que se observe una mayor virulencia en presencia de la línea celular RAW264.7 o *Caenorhabditis elegans* (Romanowski *et al.*, 2012). Este comportamiento es contrario a lo que cabría esperar, ya que mostrando sensibilidad a los agentes oxidantes deberían mostrar mayor susceptibilidad en los modelos más fisiológicos de forma similar a como lo hace el mutante *hog1* (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Sin embargo, y como en el caso de *Sko1* esto puede ser debido a que las concentraciones de los agentes oxidantes y nitrosativos empleadas en los ensayos sean más altas que las que realmente genera la línea celular RAW 264.7 (Arana *et al.*, 2007) o los modelos *in vivo*. Estos resultados sugieren que *Pho4* es prescindible para la virulencia de *C. albicans*. Otra posibilidad es que las condiciones ambientales en modelos *ex vivo* o *in vivo* afecten significativamente los resultados.

Durante la infección y colonización del tracto gastrointestinal *C. albicans* se ve expuesta a ambientes con concentraciones de oxígeno variables, que van desde ambientes normoxicos hasta ambientes anaeróbicos (Dubin and Estenssoro, 2008; Erecinska and Silver, 2001), la adaptación a estos cambios es fundamental para su patogénesis (Grahl *et al.*, 2012). Además, nuestros resultados sugieren que la discrepancia entre los resultados obtenidos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* puede ser debida a las distintas condiciones ambientales (aeróbico, microaerofilia y 5 % de CO₂) en las que tienen lugar los distintos ensayos. Resulta llamativo que el mutante *pho4* pase a ser osmotolerante e incluso resistente a agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno y arseniato) cuando se incuba con un 5 % de CO₂ (condiciones de ensayos *ex vivo*). Estas condiciones pueden favorecer un metabolismo oxidativo, ya que tanto la cepa parental como el mutante *pho4* son más sensibles a los inhibidores de la cadena transportadora de electrones (azida sódica). Además, estos fenotipos se agravan cuando se crecen las cepas en medios cuya fuente de carbono es no fermentable (como el glicerol). La reversión de los fenotipos de sensibilidad del mutante *pho4* podría ser debida a que Pho4 sea prescindible en condiciones de ausencia de oxígeno o con un 5 % de CO₂ o bien que su función o expresión dependa de las condiciones ambientales. Pho4 parece regular el metabolismo oxidativo en condiciones aeróbicas, lo que explicaría su sensibilidad a azida sódica y SHAM, la cual es más evidente cuando se usa glicerol como fuente de carbono.

Por su parte, en el modelo de estudio del estado comensal de *C. albicans* observamos que Pho4 al igual que Sko1 es prescindible para establecerse como parte de la microbiota intestinal de los ratones. El mutante *pho4* sí es capaz de establecerse como comensal alcanzando unos niveles similares a la cepa parental cuando se inocula en solitario. No obstante, la delección de *PHO4* afecta al establecimiento en el tramo del intestino delgado proximal, lo que podría deberse a la presencia en esta zona de sales biliares. Sin embargo, el mutante *pho4* muestra una mayor resistencia a este compuesto que la cepa parental, sugiriendo por tanto que para el establecimiento *C. albicans* debe hacer frente a otras sustancias producidas durante la digestión (como enzimas digestivas y pancreáticas, etc.). Para que se produzca el establecimiento *C. albicans* debe ser capaz de adherirse al tejido intestinal así como competir con la microbiota de la zona tanto bacterias (las cuales son reducidas por el tratamiento antibiótico (Koh *et al.*, 2008)) como otras levaduras. En este estado de competición, el mutante *pho4* es incapaz de adherirse en un modelo de adhesión *ex vivo* lo que se correlaciona con los menores niveles de colonización en el intestino

Discusión

delgado proximal y con una menor capacidad de establecerse como comensal en ensayos de competición. En ensayos de co-cultivo con la cepa parental se observó que el mutante *pho4* se perdía con el tiempo. Estos ensayos de adecuación biológica o “*fitness*” muestran que Pho4 es importante para que *C. albicans* pueda crecer en presencia de otras células, pueda competir por los nutrientes y mantener un metabolismo activo, podría también estar implicado en la interpretación de señales de *quorum sensing*.

Nuestros resultados indican pues, que la delección de *PHO4* altera de alguna manera el metabolismo de la célula, debido quizás a su implicación en el metabolismo del fosfato, lo que sería quizá una desventaja a la hora de competir por los nutrientes con otros organismos en el tracto gastrointestinal.

CONCLUSIONES

1. El factor de transcripción Sko1 de *C. albicans* es un represor transcripcional de genes involucrados en virulencia y desarrollo hifal en condiciones de cultivo estándar en el laboratorio. Sko1 está involucrado en la respuesta transcripcional frente a estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno, como se deduce de los patrones de sensibilidad a agentes y los estudios transcriptómicos. Igualmente, actúa como un represor de la transición levadura-hifa mediante mecanismos que parecen ser independientes de la MAP quinasa Hog1 y de la ruta mediada por PKA-cAMP.
2. Sko1 no parece ser relevante para la adhesión a la mucosa intestinal de ratón ni para la colonización del tracto gastrointestinal de ratón por *C. albicans*. Tampoco parece ser relevante en la virulencia de *C. albicans* en el modelo de infección en *Galleria mellonella*.
3. Se han identificado los factores de transcripción Ada2, Glo3, Mig1, Pho4, Orf19.2260, Rlm1 Upc2, Wor3 y Zcf31 como mediadores de la respuesta frente a estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno, menadiona o diamida.
4. El factor de transcripción Pho4 está implicado en la regulación del metabolismo oxidativo y en la respuesta a estrés osmótico, oxidativo y nitrosativo en *C. albicans*, según se deduce de su sensibilidad a compuestos inhibidores de la cadena respiratoria y agentes generadores de estrés.
5. Pho4 no es relevante para la virulencia de *C. albicans* en el modelo de infección en *Galleria mellonella*. Sin embargo, es un factor importante en la adhesión de esta levadura a la mucosa intestinal y permite alcanzar niveles altos de colonización, como se deduce de ensayos de competición en presencia de una cepa silvestre.
6. *C. albicans* es capaz de diferenciar el arseniato del fosfato, como se deduce del distinto patrón de fosforilación de MAPKs en presencia de estos compuestos. La ruta HOG media respuesta a arseniato y arsenito en *C. albicans*, siendo la respuesta a arsenito independiente de la proteína reguladora Ssk1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y líneas celulares

A. Microorganismos

Los microorganismos y cepas empleados en este trabajo se muestran en la siguiente Tabla 5. Para ayudar a la lectura de este trabajo hemos expresado las distintas cepas de *C. albicans* como genX, para la cepa homocigota genX/genX en fondo Ura⁺ (URA3/ura3). La cepa de *E. coli* se utilizó exclusivamente para la transformación y amplificación de los plásmidos que más tarde se emplearon en *C. albicans*.

MICROORGANISMO	CEPA	GENOTIPO	NOMENCLATURA EN TEXTO Y FIGURAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i>	DH5αF'	<i>K12 Δ (lacZYA-argF)u169 supE44 thi1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA relA1 (φ80lacZ ΔM15)F'</i>		(Hanahan, 1988)
<i>C. albicans</i>	CAF2	<i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	wt (CAF2)	(Fonzi and Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>		(Fonzi and Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	HI3-21	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 hog1::hisG/hog1::hisG-URA3-hisG</i>	<i>hog1</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. albicans</i>	RM100	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	wt (RM100)	(Negredo <i>et al.</i> , 1997)
<i>C. albicans</i>	RM1000	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i>		(Negredo <i>et al.</i> , 1997)
<i>C. albicans</i>	CNC13	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG-URA3-hisG/hog1::hisG</i>	<i>hog1</i>	(San José C. <i>et al.</i> , 1996)
<i>C. albicans</i>	CNC15	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG/hog1::hisG</i>		(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. albicans</i>	VIC100	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	<i>sko1</i>	(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. albicans</i>	VIC1000	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG</i>		(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. albicans</i>	VIC200	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG/hog1::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	<i>hog1 sko1</i>	(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. albicans</i>	VIC2000	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG/hog1::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG</i>		(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 2010)

<i>C. albicans</i>	VIC100-FA	<i>ura3 D::imm434/ura3 D::imm434 his1 D::hisG/his1 D::hisG sko1 D::hisG/sko1 D::hisG-URA3-hisG LEU2/prACT1-GFPSKO1-pFA::leu2</i>	<i>sko1^{reint}</i>	(Alonso-Monge et al., 2010)
<i>C. albicans</i>	VIC200-FA	<i>ura3 D::imm434/ura3 D::imm434 his1 D::hisG/his1 D::hisG hog1::hisG/hog1::hisG sko1 D::hisG/sko1 D::hisG-URA3-hisG LEU2/prACT1-GFPSKO1-pFA::leu2</i>	<i>hog1 sko1^{reint}</i>	(Alonso-Monge et al., 2010)
<i>C. albicans</i>	VIC100C	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	<i>sko1</i>	(Alonso-Monge et al., 2010)
<i>C. albicans</i>	H2D	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 tpk2Δ::cat/tpk2Δ::cat-URA3-cat</i>	<i>tpk2</i>	(Cloutier et al., 2003)
<i>C. albicans</i>	CSSK21-1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG</i>	<i>ssk1</i>	(Calera et al., 2000b)
<i>C. albicans</i>	PVY121	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434, RPS1/rps1::[Clp10]</i>	wt (PVY121)	(Vandeputte et al., 2012)
<i>C. albicans</i>	BRY429	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 rlm1::hisG/rlm1::URA3</i>	<i>rlm1</i>	Fungal Genetic Stock Center (http://www.fgsc.net)
<i>C. albicans</i>	CM1613	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 mkc1::hisG/mkc1::hisG-URA3-hisG</i>	<i>mkc1</i>	(Navarro-García et al., 1995)
<i>C. albicans</i>	BEC63-19	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG hog1::hisG/hog1::hisG mkc1::hisG-URA3-hisG/mkc1::hisG</i>	<i>hog1 mkc1</i>	(Urrialde et al., 2015)
<i>C. albicans</i>	JC482	<i>ssk2::loxP-ARG4-loxP/ssk2::loxP-HIS1-loxP</i>	<i>ssk2</i>	(Cheetham et al., 2007)
<i>C. albicans</i>	BRD3	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG pbs2Δ::cat/pbs2Δ::cat-URA3-cat</i>	<i>pbs2</i>	(Arana et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	REP12	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 ssk1::hisG/ssk1::hisG sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG</i>	<i>sho1 ssk1</i>	(Román et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	CHO31-1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434-URA3 ssk1::hisG/ssk1::hisG msb2::FTR/msb2::FRT sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG opy2::FRT/opy2::FRT</i>	<i>sho1 ssk1 msb2 opy2</i>	(Herrero de Dios C. et al., 2013)
<i>C. albicans</i>	SFY87	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG RPS1/rps1::[Clp30]</i>	wt (SFY87)	(Vandeputte et al., 2012)
<i>C. albicans</i>	SFY5	Mutante generado de la cepa BWP17 desde la colección de transposones TIGR	<i>pho4</i>	Fungal Genetic Stock Center (http://www.fgsc.net)

<i>C. albicans</i>	DAY286	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/pARG4::URA3::arg4::hisG</i>	wt (DAY286)	(Akins, 2005)
<i>C. albicans</i>	CJN854	Mutante generado de la cepa BWP17 desde la colección de transposones TIGR	<i>orf19.2260</i>	Fungal Genetic Stock Center (http://www.fgsc.net)
<i>C. albicans</i>	JMR038	Mutante generado de la cepa BWP17 desde la colección de transposones TIGR	<i>upc2</i>	Fungal Genetic Stock Center (http://www.fgsc.net)
<i>C. albicans</i>	CJN432	Mutante generado de la cepa BWP17 desde la colección de transposones TIGR	<i>wor3</i>	Fungal Genetic Stock Center (http://www.fgsc.net)
<i>C. albicans</i>	SFY5-R	<i>pho4 ARD1/ard1::tTA Ptet-PHO4myc-SAT1</i>	<i>PHO4 reint</i>	(Urrialde et al., 2015)
<i>C. albicans</i>	CAPL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 ADH1/adh1::prPHO4-CbLUC-URA3</i>	wt <i>PHO4^{PR}-CbLUC</i>	(Urrialde et al., 2015)
<i>C. albicans</i>	HOPL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 hog1::hisG/hog1::hisG ADH1/adh1::prPHO4-CbLUC-URA3</i>	<i>hog1 PHO4^{PR}-CbLUC</i>	(Urrialde et al., 2015)
<i>C. albicans</i>	RMCL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 ADH1/adh1::prCEK1-CbLUC-URA3</i>	wt <i>pCEK1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	HOCL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 hog1::hisG/hog1::hisG ADH1/adh1::prCEK1-CbLUC-URA3</i>	<i>hog1 pCEK1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VIC100-CL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG ADH1/adh1::prCEK1-CbLUC-URA3</i>	<i>sko1 pCEK1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VIC200-CL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 hog1::hisG/hog1::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG ADH1/adh1::prCEK1-CbLUC-URA3</i>	<i>hog1 sko1 pCEK1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RM-SL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 ADH1/adh1::prSKO1-CbLUC-URA3</i>	wt <i>pSKO1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	HO-SL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 hog1::hisG/hog1::hisG ADH1/adh1::prSKO1-CbLUC-URA3</i>	<i>hog1 pSKO1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VIC100-SL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG ADH1/adh1::prSKO1-CbLUC-URA3</i>	<i>sko1 pSKO1-CbLUC</i>	Este trabajo

<i>C. albicans</i>	VIC200-SL	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i> <i>sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG</i> <i>ADH1/adh1::prSKO1-CbLUC-URA3</i>	<i>hog1 sko1</i> <i>pSKO1-CbLUC</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RMT	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>pTRR1::pTRR1-RLUC-URA3</i>	<i>TRR1-RLUC</i>	(Arana <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. albicans</i>	HT	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i> <i>pTRR1::pTRR1-RLUC-URA3</i>	<i>hog1-TRR1-RLUC</i>	(Arana <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. albicans</i>	VUR2	SFY87 <i>ADH1/adh1::rtTA P_{tet}-GFP-SAT1</i>	wt (SFY87-GFP)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VUR1	SFY87 <i>ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	wt (SFY87-dTOM2)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VUR10	<i>pho4 ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	<i>pho4-dTOM2</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VUR3	DAY286 <i>ADH1/adh1::tTA pTET-MoGFP-SAT1</i>	wt (DAY286-GFP)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VUR30	<i>orf19.2260 ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	<i>orf19.2260-dTOM2</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VUR31	<i>upc2 ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	<i>upc2-dTOM2</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VUR32	<i>wor3 ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	<i>wor3-dTOM2</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RM-GFP	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>ADH1/adh1::tTA pTET-MoGFP-SAT1</i>	wt (RM100-GFP)	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VIC101	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG</i> <i>ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	<i>sko1-dTOM2</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	VIC201	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i> <i>sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG</i> <i>ADH1/adh1::tTA P_{tet}-dTOM2-SAT1</i>	<i>hog1 sko1-dTOM2</i>	Este trabajo

Tabla 5. Relación de cepas empleadas: genotipos y origen.

B. Líneas celulares y condiciones de cultivo

RAW 264.7: línea celular de macrófagos de ratón obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea se creció en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos), 4 mM glutamina (Gibco) y 1 % de estreptomicina/penicilina a 37°C en 5 % de CO₂.

Macrófagos peritoneales de ratón: se obtuvieron tras la inyección de 1 ml de tioglicolato estéril en la cavidad peritoneal del ratón. Transcurridos 4 días se sacrificaron los ratones con una atmósfera de CO₂, y los macrófagos fueron recogidas mediante lavado peritoneal con 8–10 mL de PBS en condiciones de esterilidad.

Las células de ambas líneas se trataron igual, se recogieron por centrifugación a 1000 rpm, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo a la concentración final deseada. Para determinar la densidad de la población celular adecuada se empleó una cámara de Neubauer realizándose el cuento en presencia de Trypan Blue.

2. Técnicas de Biología Molecular, manipulación de DNA y RNA

Las distintas técnicas de manipulación de DNA empleadas durante este trabajo como son el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, electroforesis de DNA en geles de agarosa, determinación de la pureza y concentración de DNA, técnicas de PCR, etc., se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

E. coli se transformó habitualmente por choque térmico según el método Hanahan (Hanahan, 1988). En el caso de *C. albicans*, para la integración de las construcciones genéticas se utilizó el sistema de transformación desarrollado por Köhler y colaboradores (Köhler *et al.*, 1997) que combina un tratamiento químico con un choque eléctrico por electroporación. Se utilizaron plásmidos que hacen uso del antibiótico nirsotricina como marcador de selección dominante (Reuss *et al.*, 2004) y plásmidos con marcador URA3 que se seleccionan en medio Ura-. Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo se recogen respectivamente en la Tabla 6 y Tabla 7.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pGEM-T	<i>Ori bla lacZ</i>	Promega.
pPM10	<i>Ori bla lacZ URA3 TPK2</i>	(Cloutier <i>et al.</i> , 2003)
pDUM-9-L	<i>Ori cat PrARD1 PrCEK1-CbLUC-3XHA ARD1Term</i>	Alonso-Monge (Sin publicar)
pNIM1R	<i>Ori bla ADH1Pr ca-tTA-R SAT1 OP4-TetOPr ADH1Term</i>	L.E. Cowen (Sin publicar)
pNIM1R-MoGFP	<i>Ori bla ADH1Pr ca-tTA-R SAT1 OP4-TetOPr MoGFP ADH1Term</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
pNIM1R-dTOM2	<i>Ori bla ADH1Pr ca-tTA-R SAT1 OP4-TetOPr CaRFP ADH1Term</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
pDUM-S-L	<i>Ori cat PrARD1 PrSKO1-CbLUC-3XHA ARD1Term</i>	Este trabajo
pDUM4-L	<i>Ori cat PrARD1 PrPHO4-CbLUC-3XHA ARD1Term</i>	(Urrialde <i>et al.</i> , 2015)
pNIM1R-PHO4-myc	<i>Ori bla ADH1Pr ca-tTA-R SAT1 OP4-TetOPr PHO4myc ADH1Term</i>	(Urrialde <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	GEN/FRAGMENTO AMPLIFICADO
o-ACTQTup	ATGGTGGTTCTATCTTGGCTTC	ACT1
o-ACTQTIw	ATCCACATTTGTTGGAAAGTAGA	
o-HWP1-QT	AATTACTCAAGTGTGCTCCTATTCT	HWP1
o-HWP1-QTIw	GTCAATCTCATGTTGTTACCAGCAC	
o-ECE1-QTup	TCAGCTGAATCTGCTTTGAAAGA	ECE1
o-ECE1-QTIw	GTGCTACTGAGCCGGCATC	
o-WH11QTup	TTGACAGTGCTGCTGGTAAAGC	WH11
o-WH11QTIw	GGACAAATGATTTGTCGTTTTGAG	
prSKO1-CbLUCUup	CCGCTAGCTTAACATGAGCAGTATGCTTG	SKO1 ^{pr} -CbLUC
prSKO1-CbLUCLow	GGGTCGACGTCTTTTTGGAATAAAAAATAAAG	
prPHO4-CbLUCup	GCTAGCGCTTGACAAAGTAATAAAGGTAAGC	PHO4 ^{pr} -CbLUC
prPHO4-CbLUClow	GTCGACTGATTTTGCTGAAATCAATGTC	
Pho4Rup	ACGCGTCGACATGGACCAGCAAGTTTGAACCC	PHO4 ^{reint}
Pho4RIw	CCGCGGCCGCCCTTCCTTCTTTCAACTCC	

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

A. Reintegración del factor de transcripción Pho4

Para la llevar a cabo la complementación de los fenotipos del mutante *pho4* se utilizó el plásmido pNIM1-R. Primero se amplificó el marco abierto de lectura del gen *CaPHO4* flanqueado por los sitios de restricción *Sal* I y *Not* I (véase los oligonucleótidos empleados en la Tabla 7). Tras la digestión con dichas enzimas de restricción el fragmento amplificado era 1958 pb fue subclonado en el plásmido pNIM1-R dando lugar al plásmido pNIM1R-*PHO4*-myc. La construcción obtenida fue digerida con las enzimas de restricción *Apa* I y *Ksp* I, obteniéndose un fragmento de 7843 pb que fue integrado en la región *ADH1* del genoma de *C. albicans*. Los transformantes fueron seleccionados en placas de YPD suplementados con 200 µg/ml de nirsotricina. La integración de la construcción se comprobó por “dot-blot”. Las cepas obtenidas se nombraron como *PHO4*^{reint}. En la Figura 84 se muestra la complementación del fenotipo de osmosensibilidad del mutante *pho4* cuando se reintegra una copia de este en el genoma.

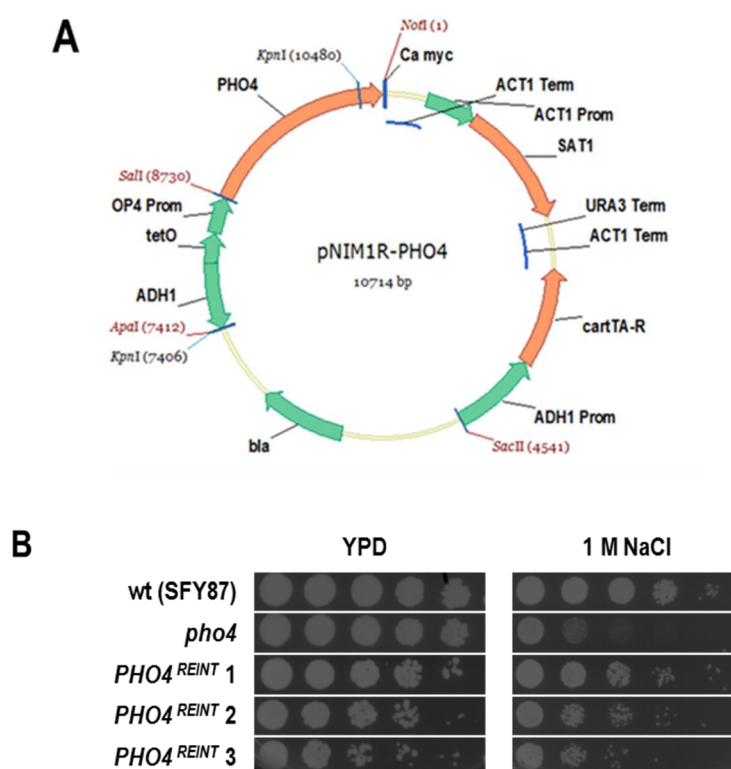


Figura 84. Construcción del plásmido pNIM1R-*PHO4*-myc y comprobación de la reintegración.

(A) Esquema del plásmido pNIM1R-*PHO4*-myc. La amplificación del ORF de *PHO4* se acopla en las dianas *Sal* I-*Not* I del plásmido pNIM1R. Se obtiene el gen *PHO4* controlado por el promotor OP4 y etiquetado con myc en C-terminal. Las regiones homólogas de la región promotora y ORF de *ADH1* permiten la integración del plásmido en el genoma de *C. albicans* en este locus.

(B) Ensayos de sensibilidad en placa para la comprobación de la reintegración del gen *PHO4* en un mutante *pho4*. Partiendo de cultivos en fase estacionaria y tras la realización de diluciones seriadas, se sembraron en placas de YPD suplementadas o no con 1 M de NaCl. Se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C y luego se escanearon.

B. Integración del gen *CbLUC*

Para los estudios de la expresión de los promotores de los genes *SKO1* y *PHO4* usando como gen reportero *CbLUC*, se amplificaron las regiones promotoras con las dianas *Sal* I-*Nhe* I incluidas en los cebadores prSKO1up y prSKO1low para *SKO1*^{pr}-*CbLUC* y prPHO4up y prPHO4low para *PHO4*^{pr}-*CbLUC*. Se obtuvieron fragmentos de 1006 pb y 1762 pb respectivamente. Tras esto, los fragmentos amplificados se cortaron con *Sal* I y *Nhe* I para luego incorporarse al plásmido pDUM-9-L en los mismos sitios diana. Finalmente las construcciones genéticas obtenidas *SKO1*^{pr}-*CbLUC* y *PHO4*^{pr}-*CbLUC* se cortaron con *Kpn* I para integrarlos en la región *ARD1* del genoma de *C. albicans* (*SKO1*^{pr}-*CbLUC* en una cepa silvestre, *hog1*, *sko1* y *hog1 sko1* y *PHO4*^{pr}-*CbLUC* en una cepa silvestre y *hog1*). Los

transformantes fueron seleccionados en placas de Medio Mínimo Ura⁻ y se comprobó la integración por cuantificación de la expresión de dicha integración (véase en Materiales y Métodos 3.F).

C. Análisis transcripcional mediante *microarrays* de DNA

Para llevar a cabo este análisis, se partió de cultivos en fase estacionaria incubados a 37°C, los cuales fueron refrescados en medio YPD e incubados de nuevo hasta que alcanzaron una D.O. de 1. Tras ello, se recogió el tiempo 0 y se añadió 5 mM de H₂O₂ durante 10 minutos. Una vez recogidas las células se procedió a la extracción del RNA que se realizó empleando el “RNeasy MIDI Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania), mediante el procedimiento de ruptura mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. La pureza e integridad del RNA se comprobó empleando el equipo Nano Bioanalyzer 2100B (Agilent Technologies).

Una vez obtenida la muestra de RNA se procedió al procesamiento de la misma (obtención del cDNA, los chips de hibridación y el análisis de imagen de los *microarrays*) que se realizó en la Unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM siguiendo el protocolo descrito por García y colaboradores (García *et al.*, 2004). Los *microarrays Candida albicans* AROS V1.2 empleados en este estudio fueron proporcionados por Operon. Para la transcripción en condiciones basales (crecimiento exponencial) se analizó el RNA total de tres cultivos diferentes; además, para cada muestra, se realizaron dos hibridaciones diferentes, incluyendo el intercambio de fluorocromos para así minimizar los errores que pudiesen aparecer debido a la variabilidad técnica. Por tanto, se emplearon seis *microarrays* de DNA para cada condición ensayada. Para comparar las muestras tratadas y no tratadas, se analizó el RNA total de dos cultivos diferentes. En este caso, todas las condiciones (la cepa silvestre tratadas y el mutante *sko1* tratadas y sin tratar) se hibridaron con la muestra no tratada de la cepa silvestre, con el fin de comparar directa e indirectamente los resultados obtenidos. Para cada muestra se realizaron dos hibridaciones diferentes, incluyendo intercambio de fluorocromos con el fin de minimizar de nuevo los cambios transcripcionales debidos a la variabilidad técnica. Los datos fueron procesados y tratados usando los métodos estadísticos previamente descritos en el trabajo de García y colaboradores (García *et al.*, 2004).

D. Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa

En los experimentos de RT-PCR cuantitativa, se aisló el RNA total de células de levadura en fase exponencial de crecimiento empleando el kit “*RNeasy MINI Kit*” (Qiagen, Hilden, Alemania) mediante el procedimiento de ruptura mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA fueron determinadas mediante la cuantificación de la absorbancia a 260 nm. La pureza e integridad del RNA fue determinada mediante el uso del bioanalizador Nano Agilent 2100B (Agilent Technologies). Seguidamente, se sintetizó la primera cadena de cDNA a partir de 2 µg de RNA total, utilizando el sistema de transcripción reversa (*Reverse Transcription System*, Promega) y oligo-dT como cebador siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los experimentos de RT-PCR cuantitativa se desarrollaron según el protocolo descrito previamente por (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2001) utilizando *SYBRGreen Universal Master Mix* (Applied Biosystems). La cuantificación de la expresión de *HWP1*, *ECE1* y *WH11* fue determinada relativamente al transcrito estándar *ACT1* (como control interno) siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Los oligonucleótidos utilizados fueron o-*ACTQTup* y o-*ACTQTlw* para la expresión de *ACT1*, o-*HWP1-QTup* y o-*HWP1-QTlw* para la expresión de *HWP1*, o-*ECE1-QTup* y o-*ECE1-QTlw* para *ECE1* y o-*WH11-QTup* y o-*WH11-QTlw* para la expresión de *WH11*, cuyas secuencias de los oligonucleótidos se recogen en la Tabla 7.

3. Manipulación y análisis de cultivo de microorganismos

A. Cultivo de microorganismos y células eucariotas

I. Medios de cultivo

Para el crecimiento de microorganismos se emplearon distintos medios de cultivo tanto en forma líquida como sólida, añadiendo a estos últimos un 2 % peso/volumen (p/v) de agar. Para la disolución de los mismos se empleó agua desionizada por los sistemas de purificación Millipore, posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C con una atmósfera de sobrepresión durante aproximadamente 20 minutos. A continuación en la Tabla 8 se detallan los medios de cultivos empleados en este trabajo.

Materiales y Métodos

MEDIO	COMPOSICIÓN	UTILIDAD	REFERENCIA
LB	1% triptona, 0.5 % extracto de levadura y 0.5 % NaCl	Medio utilizado para el crecimiento de bacterias. La adición de ampicilina a 100 µg/ml se realizó para seleccionar transformantes portadores de plásmidos con resistencia a dicho antibiótico.	(Sambrook et al., 1989)
Medio Mínimo (MM) Ura-	2 % glucosa, 0.17 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 0.19 % de mezcla de aminoácidos comercial sin uracilo (Formedium)	Medio para el crecimiento de levaduras. Se suplementa con los aminoácidos correspondientes para la selección de transformantes portadores de diferentes marcadores de auxotrofías así como para el mantenimiento de estas cepas resultantes.	(Sambrook et al., 1989)
YPD	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % de glucosa.	Medio completo para el cultivo de levaduras. La adición de nirsotricina a 200 mg/l se realizó para la selección de transformantes portadores del plásmido integrativo cuya construcción genética portan el gen de resistencia al citado antibiótico (pNIM1 y derivados).	(Sambrook et al., 1989)
YPG	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % de glicerol.	Medio completo para ensayos de respiración de levaduras.	(Sambrook et al., 1989)
SPIDER	1 % caldo nutritivo, 1 % manitol, 0.2 % K_2HPO_4 , 1.4 % agar.	Medio de inducción de la filamentación en <i>S. cerevisiae</i> y en <i>C. albicans</i> .	(Liu et al., 1994)
SLADH (Synthetic low-ammonium dextrose histidine)	2 % glucosa, 0.67 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.005 % histidina. En medio sólido es necesario lavar el agar con agua destilada para asegurar el bajo contenido en nitrógeno.	Medio de ayuno de nitrógeno, inductor del crecimiento pseudohifal.	(Gimeno et al., 1992)
SD	2 % glucosa, 0.17 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.19 % de mezcla de aminoácidos.	Medio de composición definida utilizado para el crecimiento de levaduras de forma rutinaria.	(Sambrook et al., 1989)
SD ↓Pi	2 % glucosa, 0.57 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni fosfatos (MP Biomedicals) 0.5 % $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0.19 % de mezcla de aminoácidos.	Medio de composición definida utilizado en la caracterización del mutante <i>pho4</i> y análisis en ausencia de fosfato.	

RPMI 1640 completo	Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa al que se le añade suero (10 %), glutamina y antibióticos (1 % penicilina/estreptomicina)	Medio rico para el cultivo de células eucariotas superiores.	Gibco
--------------------	---	--	-------

Tabla 8. Medios de cultivo utilizados.

II. Compuestos adicionales

En la Tabla 9 se muestran los compuestos adicionales con los que se suplementaron los medios generales de cultivo para la realización de los ensayos de este trabajo.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN	CARACTERÍSTICA Y UTILIDAD
Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	5, 7 y 10 mM	Estudios de sensibilidad a estrés oxidativo.
Menadiona	150 y 200 µM	Generadores de iones superóxido.
Diamida	1,2, 3 y 5 mM	Estudios de estrés oxidativo.
S-nitrosoglutation (GSNO)	0.6 mM	Generador de estrés nitrosativo espontáneo en solución.
Cloruro sódico (NaCl)	1 y 1.5 M	Aumento de la osmolaridad externa.
Sorbitol	1 y 2 M	Estudio de sensibilidad a estrés osmótico
Rojo Congo (CR)	75, 150 y 225 µg/ml	Daño en pared celular. Une a quitina e inhibe β-(1,3)-glucano <i>in vitro</i> .
Blanco de calcoflúor (CW)	12, 24 µg/ml	Daño en pared celular. Interfiere en la correcta cristalización de las moléculas de quitina.
Caspofungina	40 µg/ml	Inhibidor de la síntesis de β-(1,3)-glucano.
Arseniato sódico (As (V) Na ₂ AsO ₄ -H ₇)	1, 2 y 4 mM	Análogo del fosfato.
Arsenito sódico (As (III) NaAsO ₂)	1, 2 y 4 mM	Generador de estrés oxidativo entre otros efectos tóxicos.
Fosfato inorgánico (KH ₂ PO ₄)	2 mM	Suplemento nutricional.
Azida Sódica	0.025 y 0.05 ‰	Inhibidor del complejo IV de la cadena transportadora de electrones.
Ácido salicilhidroxilamínico (SHAM)	2 y 3 mM	Inhibidor de la oxidasa alternativa.
Ampicilina	100 µg/ml	Antibiótico usado para la selección de transformantes en <i>E. coli</i> que porten la resistencia a este antibiótico.
Cloranfenicol	20 µg/ml	Antibiótico usado para evitar el crecimiento de bacterias en medios empleados para el crecimiento de levaduras así como para la selección de transformantes que porten la resistencia a este antibiótico.
Nursotricina	200 µg/ml	Antifúngico empleado para la selección de los transformantes con el plásmido pNIM1R.
Suero fetal bovino estéril	5 y 100 %	Medio inductor de la filamentación en <i>C. albicans</i> .

Tabla 9. Compuestos adicionales empleados en este trabajo.

III. Condiciones de oxigenación

Los ensayos en placa se incubaron en distintas condiciones de oxigenación. Para ello se emplearon jarras de anaerobiosis y el sistema comercial *GenBox Anaer* (Biomérieux) para generar un ambiente de anaerobiosis y *GenBox Microaer* (Biomérieux) para generar microaerofilia. También se empleó una estufa de cultivos celulares a 37°C, 5 % de CO₂ y una humedad relativa controlada.

B. Ensayos de sensibilidad en placa

Los ensayos de sensibilidad/resistencia en medio sólido se realizaron a partir de cultivos en la fase deseada de crecimiento (fase estacionaria o fase exponencial (D.O.=1)). Se prepararon suspensiones a densidad óptica 0.8 (1 unidad de D.O. equivale aproximadamente a 2.5×10^7 células/ml) y se realizaron diluciones seriadas 1/10. Finalmente se depositaron con ayuda de un replicador 5 µl de cada dilución en placas de YPD y placas de YPD o YPG suplementadas con el compuesto a estudiar, de forma que cada gota contuviese aproximadamente 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 y 50 células. Las placas se incubaron a 37°C en un ambiente aerobio durante 24 horas salvo que se indique lo contrario en las figuras.

La colección de los mutantes en factores de transcripción de *C. albicans* se analizó mediante ensayos de sensibilidad en placa. Se partió de cultivos en fase estacionaria y tras la preparación de suspensiones con 2.5×10^7 células/ml, se realizaron las distintas diluciones seriadas en distintas placas multipocillo (correspondiendo cada placa multipocillo a una dilución decimal, ya que se analizaban aproximadamente 40 mutantes cada vez) (Figura 85). Se sembraron con ayuda de un replicador en placas de YPD y YPD suplementadas con el agente a analizar y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

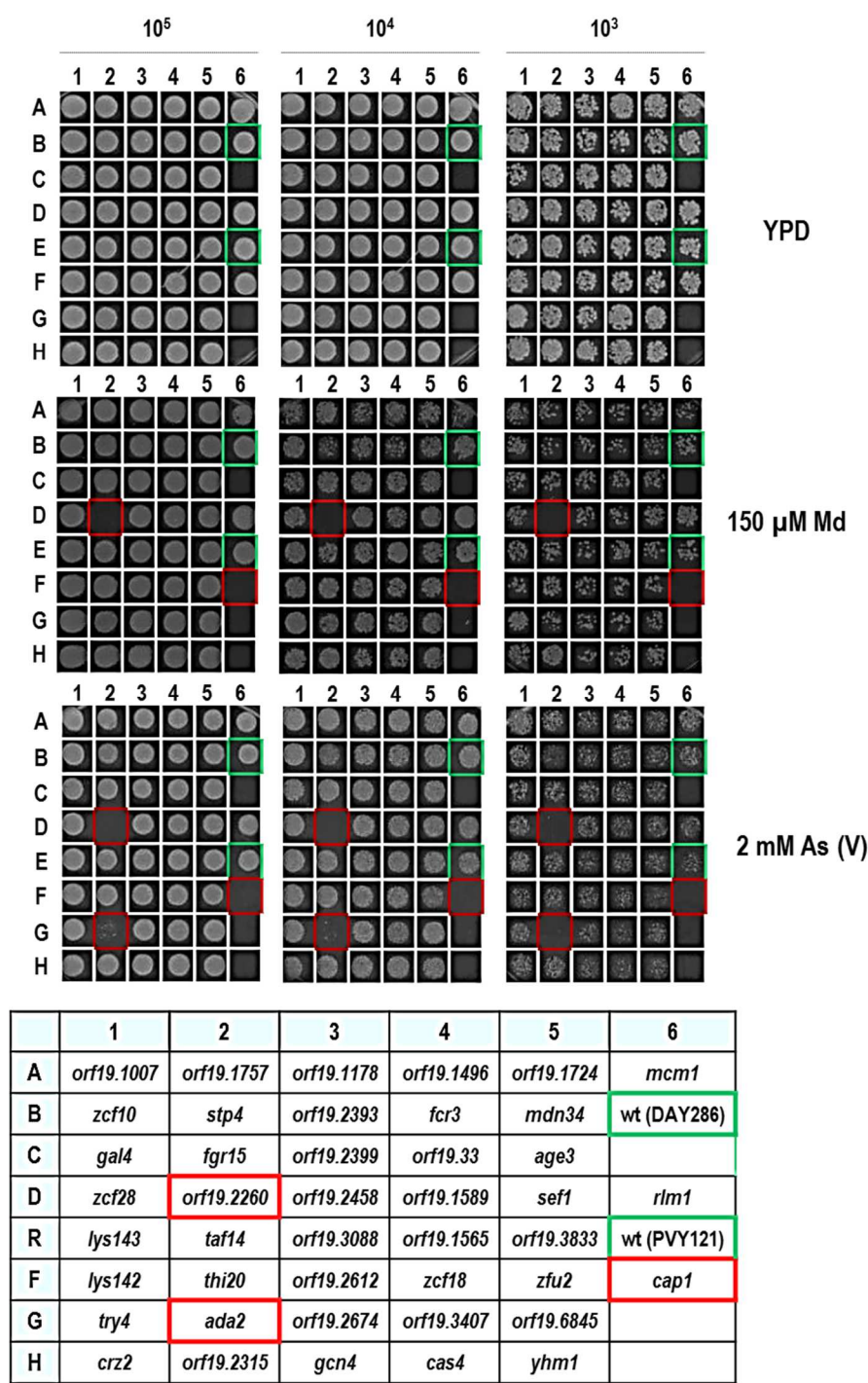


Figura 85. Sensibilidad/resistencia de mutantes de *C. albicans* alterados en factores de transcripción a agentes causantes de estrés.

En la figura se muestra un ejemplo de los ensayos de sensibilidad en placa. En distintas placas multipocillo se realizaron diluciones seriadas de los distintos mutantes y sus controles a analizar. Con la ayuda de un replicador se depositaron las gotas en los distintos medios que fueron incubados durante 24 h a 37°C. El panel inferior indica la colocación de cada uno de los mutantes en factores de transcripción en las placas a estudiar. Los recuadros en rojo señalan aquellos mutantes que mostraron sensibilidad o déficit de crecimiento frente al compuesto ensayado, mientras que los recuadros en verde muestran las cepas parentales. Las cepas parentales se sembraron después de los mutantes obtenidos a partir de ellas, como control de placa se añadió el mutante *cap1* (señalado en rojo).

C. Ensayos de viabilidad por cuantificación de UFCs

Los estudios de viabilidad frente a líneas celulares y S-nitrosoglutation (GSNO) se realizaron mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) en medio sólido YPD o SD.

En la cinética de viabilidad frente a GSNO, se incubaron las cepas en medio rico YPD durante 16 horas y se igualaron las concentraciones de las distintas cepas a ensayar a 2×10^6 células/ml en YPD. Tras la recogida del tiempo 0, se trataron con 0.6 mM de GSNO y se incubaron en agitación a 37°C recogándose muestras a 1, 2 y 4 horas. Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas correspondientes en PBS y se sembraron en placas YPD o SD que se incubaron a 37°C durante 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes.

Para estudiar la viabilidad frente a la línea celular RAW 264.7 esta fue resuspendida el día anterior al experimento a una concentración de 5×10^5 células/ml por pocillo en medio RPMI 1640 completo. Al día siguiente se eliminó el medio y se añadieron las levaduras en una multiplicidad de infección 1:40 (levaduras:macrófagos) en un volumen de 200 μ l. Los co-cultivos se incubaron a 37°C en 5 % CO₂ durante 2 horas. Posteriormente se añadió 800 μ l de agua estéril para la recuperación de las células viables de *C. albicans*, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio rico YPD y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

En el caso de los macrófagos peritoneales, se depositaron 1×10^6 células/ml por pocillo en medio RPMI 1640 completo. Transcurridas 24 horas se eliminó el medio y se añadieron las células de levaduras en RPMI en una multiplicidad de 1:40 (levaduras:macrófagos peritoneales) en un volumen de 200 μ l. Los co-cultivos se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se desechó el sobrenadante y se añadieron 800 μ l de agua estéril con 0.05 % de SDS durante 30 minutos en agitación para lisar las células de ratón. Las levaduras se recogieron y se sembraron distintas diluciones en medio YPD suplementado con cloranfenicol (20 μ g/ml) y se incubaron 24 horas a 37°C para su recuento.

Los experimentos se realizaron por triplicado expresando el porcentaje de viabilidad de cada cepa como el porcentaje de reducción de UFCs de los co-cultivos de células fagocíticas-levadura frente a los cultivos iniciales, de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Viabilidad} = 100 - \frac{\text{UFCs Inicial} - \text{UFCs Final}}{\text{UFCs Inicial}}$$

Donde UFCs Inicial son las UFCs correspondientes al inóculo y UFCs Final se corresponden con las UFCs obtenidas tras el co-cultivo con las células fagocíticas.

D. Ensayos de morfogénesis

Para los estudios de filamentación en medio líquido se partió de un preinóculo en medio YPD, de las cepas a estudiar, tras incubación de 16 horas a 30°C. Se inocularon 2×10^6 células/ml en 3 ml de YPD suplementado con suero fetal bovino y se incubaron a 30°C, recogiendo muestras de forma periódica. Se emplearon dos cantidades de suero 5 % y 100 % para condiciones subinductoras e inductoras respectivamente. Se realizó otro estudio de filamentación en líquido, en este caso las cepas eran inoculadas en medio mínimo con unos pH de 4.3 y 6.7 suplementando el primero con 5 % de suero fetal bovino. Tras la inoculación se incubaron a 37°C recogiendo muestras de forma periódica. Las muestras de ambos estudios fueron fijadas con paraformaldehído al 2 %, para posteriormente hacer las fotografías.

En los estudios de invasión y morfología en medio sólido se partió de células provenientes de cultivos en fase estacionaria inoculados en medio líquido YPD e incubados a 37°C. Dichos cultivos se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar los restos del medio líquido YPD. Tras la medición de la densidad óptica de los cultivos lavados se realizaron las diluciones pertinentes que permitieron la siembra de entre 50 y 100 células por placa. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 10 días, finalmente se tomaron las imágenes para poder visualizar los bordes coloniales.

E. Técnica de microscopía óptica

La observación de las muestras biológicas de levadura en fresco o de células fijadas se llevó a cabo mediante un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U. Las imágenes fueron tomadas a través de una cámara Panasonic CCD acoplada al microscopio, utilizando el programa informático Aquacosmos 1.3 para la captura de imágenes. Para las imágenes de los estudios de morfogénesis e invasión, estas fueron tomadas a través de una cámara de color acoplada a una lupa, mediante el uso del soporte informático D-SCALER de captación de imágenes en condiciones uniformes para todas ellas. Las imágenes fueron posteriormente procesadas para una mejor visualización, mediante la modificación del brillo y contraste, pero siempre de forma uniforme.

F. Determinación *in vitro* de la actividad luciferasa

Para la realización de los ensayos de determinación de la expresión de los genes *CEK1*, *SKO1* y *PHO4* mediante la actividad luciferasa, tras la realización del tratamiento correspondiente, se recogieron las células mediante centrifugación a 13000 rpm. Seguidamente se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron a una concentración de 5×10^7 células/mL en buffer de luciferasa (15 mM MgSO_4 , 30 mM [pH = 2.5] citrato sódico), o en buffer RLUC (0.5 M NaCl, 0.1 M K_2HPO_4 [pH = 6.7], 1 mM Na_2EDTA , 0.6 mM azida sódica, 1 mM PMSF [phenylmethylsulphonyl fluoride] y 0.02 % albumina sérica bovina) (Srikantha *et al.*, 1996).

Para la medición de la luminiscencia se mezclaron 50 μl de las suspensiones celulares con el mismo volumen de una solución de luciferina 100 mM (SIGMA) en buffer de luciferasa o solución de “colentracina h” 10 μM (Assay Designs, Inc) en buffer RLUC. La señal de luminiscencia se cuantificó en un luminómetro (OPTCOMP I) durante 30 segundos en modo de integración de señal expresándose los resultados como la señal emitida por 2.5×10^6 células de levadura. Cada medida se realizó por triplicado y se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

G. Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi$)

Para medir la producción de especies reactivas de oxígeno que se producen en el interior de la célula empleamos el fluorocromo dihidrofluoresceína diacetato (DHF). Una vez que entra en la célula y reacciona con las ROS, emite fluorescencia en verde que puede ser cuantificada por citometría de flujo.

El potencial de membrana mitocondrial resulta del paso de electrones a través de la cadena respiratoria, y su interrupción provoca una disminución del mismo. Se cuantifica de forma indirecta mediante la acumulación de la Rodamina 123 (R123) en el interior de las mitocondrias activas, ya que al tener carga positiva penetra en el interior de la mitocondria en respuesta al gradiente de $\Delta\psi$ negativo del interior de las mismas.

Para ambos tipos de ensayos se partió de cultivos que se encuentran a una D.O. = 1 e incubados en medio YPD o SD y a 37°C se expusieron durante 60 o 90 minutos a unas concentraciones de 10 mM de peróxido de hidrógeno, 4 mM de arseniato sódico (As V), 4 mM de arsenito sódico (As (III)) y 0.025 % de azida sódica. Faltando 30 minutos para la conclusión del tiempo de incubación con los compuestos a ensayar se les añadió la DHF a una concentración final de 50 μ M o bien la R123 a una concentración final de 20 μ M. Transcurrido ese tiempo se lavaron las muestras dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 1×10^6 células/ml y se cuantificó la fluorescencia por citometría de flujo en el canal FL1 (10000 células fueron las analizadas). Para estos análisis se empleó el citómetro FACScan cytometer (Becton Dickinson) del servicio de citometría de la UCM y los resultados fueron analizados mediante el software Flowing Software 2.5.1.

4. Manipulación de proteínas

A. Obtención de extractos proteicos

En los estudios de la activación de las MAP quinasas, se partió de cultivos en fase estacionaria que eran diluidos a D.O.=0.1 en medio rico YPD (o medio SD y SD \downarrow Pi) previamente atemperado a 37°C e incubados nuevamente a 37°C. Cuando la D.O llegaba a 1 se añadían los compuestos a la concentración a ensayar (NaCl, peróxido de hidrógeno, menadiona, derivados del arsénico y fosfato) y se recogían muestras a los tiempos que se

indican en las figuras. Las muestras eran recogidas en tubos Falcon en hielo previamente enfriados (aproximadamente 10 ml a una D.O.=1) y se centrifugaron a 4°C. Después, se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis a 4°C (50 mM Tris-HCl pH = 8, 10 % glicerol, 1 % tritonX-100, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM de NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 50 mM beta-glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico, 5 mM EDTA pH = 8) para ser transferidos a tubos de 1.5 ml.

Para los ensayos en los cuales posteriormente se iban a inmunoprecipitar las proteínas se empleó un buffer especial que no contiene fosfatasas ni SDS ni Tritón. Las células eran lisadas en 200 µl del siguiente buffer: 50 mM Tris-HCl pH = 8, 10 % glicerol, 1 mM EDTA pH = 8, 150 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 50 mM de NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 50 mM beta-glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico.

Los extractos proteicos eran obtenidos por la ruptura con perlas de vidrio como se describe para levaduras (Martin *et al.*, 2000) con la excepción de que los pulsos de ruptura en las Fast-prep son de 3 repeticiones de 30 segundos cada una.

B. Inmunoprecipitación de la proteína Pho4-Myc

En el ensayo de inmunoprecipitación se emplearon unas bolas magnéticas (Dynabeads® Protein G) que permiten la unión del anticuerpo por su región Fc y la posterior fusión de la proteína Pho4-Myc al anticuerpo.

Se resuspendieron las bolas magnéticas en el vial y se transfirieron 50 µl a un tubo Eppendorf que se colocó sobre un imán y se retiró el sobrenadante. Tras retirar el tubo que contenía las bolas magnéticas del imán se añadió el anticuerpo anti-Myc diluido en 200 µl de PBS+Tween-20 y se incubaron con rotación durante 5 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se puso de nuevo en el imán, se retiró el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS+Tween-20 (quitándolo cada vez del imán, resuspendiéndolo y volviéndolo a poner en el imán para retirar el sobrenadante). Tras la retirada del último sobrenadante se añadió el extracto proteico a inmunoprecipitar (aproximadamente 200 µl), se retiró del imán y se resuspendió con pipeta para mezclar el complejo Dynabeads-anticuerpo c-Myc con el extracto proteico. Se incubó durante 16 horas a 4°C para permitir la unión del antígeno al complejo. Tras la incubación se puso de nuevo la muestra en el imán y se retiró el

sobrenadante y se lavó tres veces con el buffer de lisis de inmunoprecipitar y se resuspendió en 200 µl de buffer de lisis.

C. Tratamiento de Pho4-Myc *in vitro* con fosfatasa alcalina

Tras llevar a cabo la inmunoprecipitación, el complejo formado por las Dynabeads con el anti-Myc y fusionadas a Pho4-Myc fue lavado tres veces con el buffer de lisis de inmunoprecipitar y posteriormente otras tres veces con el buffer de la fosfatasa alcalina (0.5 M Tris-HCl pH = 8.5 y 1 mM EDTA pH = 8.5). Finalmente se resuspendió en 600 µl de buffer de fosfatasa alcalina y se separó en tres muestras. Sobre dos de ellas se añadieron 10 µl de la fosfatasa alcalina (CIAP=*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*), previamente se había añadido sobre una de las dos muestras 1 mM de ortovanadato sódico (inhibidor de la fosfatasa alcalina). Las tres muestras se incubaron durante 20 minutos a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se pusieron las muestras de nuevo en el imán y se eliminó el sobrenadante, tras lo cual se adicionó el tampón de carga de proteínas SDS-PAGE 2x para detener la reacción.

D. Electroforesis de proteínas y transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa

La concentración proteica de dichos extractos fue igualada con tampón de carga SDS-PAGE 2x (0.1 M Tris-HCl pH = 6.8, 20 % glicerol, 4 % SDS y azul de bromofenol) tras la medición de la absorbancia a 280 nm (1 unidad de D.O.₂₈₀ equivale a 1 mg/mL de proteína) en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Los extractos tras ser igualados fueron hervidos durante 10 minutos y finalmente centrifugados durante 5 minutos a 13000 rpm para eliminar los restos celulares.

Las muestras proteicas se separaron mediante una electroforesis en SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8 % (en los ensayos de movilidad electroforética) y del 10 % (muestras en general) en cubetas Miniprotean (Bio-Rad), empleando un tampón de electroforesis de Tris-glicina-SDS y un voltaje constante de 150 voltios. La concentración de proteínas que se cargaba en cada pocillo era de entre 50 y 100 µg, se usaba como patrón de peso molecular los suministrados por Invitrogen y AppliChem. Al finalizar la separación de las proteínas, estas se transferían a unas membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL,

Amersham) sumergidas en cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) con un tampón de transferencia (Tris-glicina-SDS-metanol) durante una hora con un voltaje de 100 V.

E. Inmunodetección

Para la inmunodetección de las membranas (con las proteínas transferidas) se llevó a cabo primero un bloqueo de las mismas en leche al 5 % de PBS Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Las membranas seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en leche al 1 % en PBS Tween-20 durante 2 horas o toda la noche. Tras realizar tres lavados de 5 minutos con PBS Tween-20, se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras volver a realizar de nuevo tres lavados con PBS Tween-20 durante 30 minutos se revelan las membranas por el sistema fluorescente Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Tras un último lavado con agua desionizada las membranas eran escaneadas con el escáner Odyssey. Los anticuerpos empleados se resumen en la Tabla 10.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	CASA COMERCIAL
Anti phospho p38 (Thr180/tyr182)	Policlonal de conejo	New England Biolabs, Inc
Anti phospho p44/42 (Thr202/Tyr204)	Monoclonal de conejo	Cell Signalling
Anti-SchHog1	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotech
Anti-Gst-Mkc1	Policlonal de conejo	(Navarro-García <i>et al.</i> , 2005)
Anti-Myc Tag (Clone 4 ⁶)	Monoclonal de ratón	Millipore
IRDye 800CW Goat anti-rabbit	Anticuerpo secundario (verde)	Li-cor Biosciences
IRDye 800CW Goat anti-mouse	Anticuerpo secundario (verde)	Li-cor Biosciences

Tabla 10. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas

Algunas veces las membranas fueron deshibridadas con el tampón de deshibridación NewBlot Nitro Stripping Buffer LI-COR durante 15 minutos, para posteriormente volver a bloquear e incubar con otros anticuerpos.

Para la comprobación de la integración de las distintas construcciones genéticas se realizó, como se ha mencionado anteriormente, un “*dot blot*”. Para ello, una vez obtenidas las proteínas se depositan 5 µl en una membrana de nitrocelulosa, se deja secar al aire y se sigue el protocolo descrito para la inmunodetección.

5. Ensayos de interacción con el hospedador

A. Modelo de virulencia *Galleria mellonella*

En el ensayo de virulencia se emplearon larvas del lepidóptero *G. mellonella* en estadio seis de la casa comercial Alcotán Valencia S.L.U, de aproximadamente 0.3-0.5 gramos, que no presentaran manchas grises u oscuras en la cutícula y que no mostraran dificultad de movimientos.

La inoculación de las larvas se llevó a cabo en el hemocoele a través de la pro-pata inferior izquierda con una jeringuilla Hamilton. Se inocularon 20 larvas por cada cepa a ensayar con 10 μ l de suspensión de distintas concentraciones: 1×10^6 células/mL y 5×10^5 células/mL. Se emplearon también 20 larvas para el control de estrés por inóculo (inoculadas con la misma cantidad (10 μ l) de PBS que las infectadas con las cepas) y 10 larvas que no fueron pinchadas ni manipuladas. Se las depositó en placas Petri en grupos de 10 individuos con un lecho de comida y se incubaron en oscuridad a 37°C.

Durante nueve días se hace un seguimiento diario de las larvas, eliminando aquellas que no respondieran a estímulos mecánicos (considerándolas muertas) y descartando aquellas que hubiesen alcanzando la fase de pupa.

B. Ensayo de colonización en modelo de ratón

I. Protocolo general

Los ensayos de colonización por parte de los distintos mutantes en factores de transcripción de *C. albicans* se han llevado a cabo en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, localizado en la Facultad de Medicina (Campus de Moncloa). En todos los casos se han empleado ratones hembra C57BL/6J (B6) de 6-8 semanas de edad procedentes de Harlan Laboratories.

Para la realización de dichos experimentos los ratones se separan en grupos de entre 3 y 6 ratones en jaulas con lecho y con cantidades ilimitadas de comida y bebida. Tras la recepción de los mismos se les deja un periodo de aclimatación de una semana durante el cual se les realiza un marcaje en la oreja para su seguimiento individual. Pasado ese tiempo se les instaura un tratamiento antibiótico a través de la bebida que durará todo el

experimento. Dicho tratamiento consta de una mezcla de antibióticos con 2 mg/ml de estreptomicina (Sigma), 1 mg/ml de bacitracina (Sigma) y 0.1 mg/ml de gentamicina (Sigma) en agua estéril.

Tras 4 días desde la implantación del tratamiento antibiótico se procede a la inoculación de una suspensión de 10^7 levaduras en 100 μ l de PBS estéril a través de una cánula intragástrica. Para la suspensión se partió de cultivos crecidos durante 16 horas, cuyas levaduras son lavadas con PBS estéril antes de ajustar la concentración de la suspensión.

De forma periódica, cada dos-tres días se recogieron muestras de heces frescas de cada ratón para comprobar la presencia de *C. albicans*. El tratamiento de dichas heces consistía en la homogenización mecánica de estas en PBS estéril ajustándose a una concentración de 40 mg/ml. Tras ello se procedió al sembrado directo y de las diluciones adecuadas en placas de SD-agar suplementadas con cloranfenicol para la determinación de *C. albicans* por recuento de UFCs. Tras incubar durante 48 horas a 37°C se procedió al recuento de UFCs.

II. Análisis del contenido intestinal

El contenido intestinal fue analizado *post mortem* tras su obtención en condiciones de asepsia del intestino completo. Una vez obtenido se separó en las distintas porciones a analizar (porción proximal y distal del intestino delgado, intestino grueso y ciego) y se homogeneizó mecánicamente en PBS estéril ajustándolo a una concentración de 40 mg/ml, prosiguiendo con su siembra en placas de SD-agar suplementadas con cloranfenicol e incubación de 48 horas a 37°C para realizar el recuento de UFCs.

III. Ensayos de adhesión a tejido intestinal

La adhesión *ex vivo* se determinó sobre un fragmento de 1 cm de longitud de la porción larga del intestino de un ratón recién sacrificado. Esta porción se abrió longitudinalmente, fue lavada cuidadosamente con PBS estéril y colocada sobre una cámara de metacrilato con un diámetro de 4 mm rellena de medio RPMI atemperado a 37°C.

Partiendo de cultivos incubados toda la noche en medio YPD a 37°C, se preparó una suspensión de $2,5 \times 10^7$ células/ml en medio RPMI. Se inocularon 10^6 levaduras sobre el

lumen del tejido intestinal colocado en la cámara de metacrilato y se incubaron durante 150 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se lavó cuidadosamente la pieza de tejido intestinal con PBS estéril dos veces y se disgregó de forma mecánica, liberando las células de *C. albicans* que se han adherido al tejido. Tras realizar las diluciones decimales correspondientes se sembraron en placas de SD con cloranfenicol (20 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 48 horas para realizar el recuento por UFCs de las células adheridas.

6. Estadística y soporte informático

Salvo que se indique lo contrario se calcularon y se representan las medias de los valores \pm el error estándar de la media (SEM) o la desviación estándar. Para la comparación de las medias entre dos grupos se usó la prueba *t* de Student apareada de dos colas. La comparación entre 3 o más grupos se llevó a cabo por un análisis *one-way* ANOVA con *post-test* de Dunnett (comparación con el control). La comparación entre dos o más grupos con respecto a distintos tiempos se realizó mediante un análisis *two-way* ANOVA con *post-test* de Bonferroni (comparación con el grupo control). Los niveles de significación fueron de * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P < 0.0001$.

Para el análisis y representación de los distintos resultados de este trabajo se han empleado los siguientes programas informáticos:

Prism (GraphPad). Programa de integración, representación y análisis estadístico de los datos.

Flowing Software 2. Programa de análisis y representación de los datos obtenidos por citometría de flujo.

También se han consultado diferentes bases de datos y se han empleado diferentes herramientas bioinformáticas disponibles en Internet. Las más utilizadas han sido las siguientes:

Pubmed. Base de datos de revistas científicas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Materialles y Métodos

CGD *Candida* Genome Database. Base de datos de Leland Stanford Junior University en la cual disponemos del genoma completo de *C. albicans*. <http://www.candidagenome.org>.

***Candida* DB World Wide Web Server.** Base de datos desarrollada por el Consorcio europeo Galar Fungail para el análisis del genoma de *C. albicans*. Contiene información sobre secuencias de DNA, proteínas, homólogos en *S. cerevisiae*, etc. <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>.

Fungal Genetic Stock Center. Base de datos donde está depositada la colección de los mutantes en factores de transcripción empleados en este trabajo. <http://www.fgsc.net/candida/FGSCcandidaresources>.

***Saccharomyces* genome Database (SGD).** Servidor de la Universidad de Stanford con acceso a herramientas para el análisis de secuencias de *S. cerevisiae*, proyectos de genómica funcional, bibliografía, etc. <http://www.yeastgenome.org/>.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Permite la búsqueda de homologías y las comparaciones entre todas las secuencias disponibles en las bases de datos, tanto de DNA como de proteínas. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

ClustalW2 Multiple Sequence Alignment. Programa que permite realizar alineamientos de múltiples secuencias. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Protein Domain Database (PRODOM). Base de datos de búsqueda de motivos estructurales de proteínas. <http://www.prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>.

Genecodis. Herramienta web para el análisis de los genes. <http://www.genecodis.dacya.ucm.es>.

Venny. Herramienta interactiva para la generación de diagramas de Venn. <http://www.bioinfoqnp.cnb.ucm.es/tools.php>.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución por comunidades autónomas de las principales especies de <i>Candida</i> identificadas en pacientes con fungemia en España.	30
Figura 2. Polimorfismo de <i>C. albicans</i>	34
Figura 3. Transición blanca/opaca en <i>C. albicans</i>	36
Figura 4. Esquema general de las rutas de transducción de señales.	38
Figura 5. Efectos de los nutrientes sobre la patogénesis de <i>C. albicans</i>	39
Figura 6. Cascada de señalización de pH en <i>C. albicans</i>	41
Figura 7. Efectos producidos por el calor y mecanismo de señalización.	43
Figura 8. Esquema general de las rutas mediadas por MAP quinasas.	44
Figura 9. Rutas de transducción de señales mediadas por las MAP quinasas Mkc1 y Cek1 en <i>C. albicans</i>	46
Figura 10. Rutas implicadas en la respuesta a estrés osmótico en <i>C. albicans</i>	48
Figura 11. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	50
Figura 12. Ruta de activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo en <i>C. albicans</i>	52
Figura 13. Fenotipo de las cepas delecionadas en <i>SKO1</i> en presencia de estrés osmótico.	68
Figura 14. Cinética de expresión de <i>SKO1^{pr}-CbLUC</i> en respuesta a estrés osmótico.	69
Figura 15. Sensibilidad a agentes oxidantes de las cepas delecionadas en <i>SKO1</i>	70
Figura 16. Sensibilidad a H ₂ O ₂ y menadiona de los mutantes <i>sko1</i> y <i>hog1 sko1</i> en caída de viabilidad.	71
Figura 17. Cinética de fosforilación de las MAP quinasas en respuesta a estrés oxidativo.	73
Figura 18. Umbral de fosforilación de las MAP quinasas en presencia de peróxido de hidrógeno.	74
Figura 19. Cinética de expresión de <i>SKO1^{pr}-CbLUC</i> en respuesta a estrés oxidativo.	75
Figura 20. Expresión de <i>SKO1^{pr}-CbLUC</i> y <i>TRR1p-RLUC</i> en presencia de estrés oxidativo.	76
Figura 21. Cuantificación de la expresión del gen <i>WH11</i> mediante PCR cuantitativa.	80
Figura 22. Diagramas de Venn en los que se muestran los conjuntos de genes regulados en respuesta a estrés oxidativo.	82
Figura 23. Susceptibilidad a compuestos que alteran la pared celular.	84
Figura 24. Patrón de fosforilación de Cek1 en mutantes <i>sko1</i> en salida de fase estacionaria.	85

Lista de Figuras

Figura 25. Cuantificación de la expresión de <i>CEK1^{pr}-CbLUC</i> en salida de fase estacionaria.	86
Figura 26. Inducción de la expresión de <i>CEK1^{pr}-CbLUC</i> en salida de fase estacionaria relativizado al basal de la cepa silvestre.	87
Figura 27. Capacidad de filamentación en medio líquido de los mutantes <i>sko1</i>	89
Figura 28. Efecto del pH y de la sobreexpresión de <i>TPK2</i> en la transición dimórfica.	90
Figura 29. Morfología colonial de mutantes <i>SKO1</i>	92
Figura 30. Morfología del borde colonial en cepas que sobreexpresan <i>TPK2</i>	93
Figura 31. Expresión de genes relacionados con el desarrollo hifal.	95
Figura 32. Capacidad de colonización de mutantes en <i>SKO1</i> en competición con su parental.	97
Figura 33. Presencia de la cepa parental y los mutantes <i>sko1</i> y <i>hog1 sko1</i> en el lumen intestinal.	98
Figura 34. Crecimiento de los mutantes <i>SKO1</i> en presencia de sales biliares.	99
Figura 35. Ejemplo de comprobación de los distintos clones de un mismo mutante frente a estrés oxidativo.	101
Figura 36. Sensibilidad en placa de los mutantes seleccionados a distintos compuestos generadores de estrés.	103
Figura 37. Supervivencia de diferentes cepas silvestres y el mutante <i>pho4</i> en el modelo de virulencia <i>Galleria mellonella</i>	104
Figura 38. Supervivencia de distintos mutantes en el modelo de virulencia <i>Galleria mellonella</i>	105
Figura 39. Viabilidad de los mutantes en factores de transcripción en presencia de fagocitos.	107
Figura 40. Niveles de colonización gastrointestinal de los mutantes <i>pho4</i> y <i>orf19.2260</i> en un modelo murino.	109
Figura 41. Niveles de colonización gastrointestinal de los mutantes <i>upc2</i> y <i>wor3</i> en un modelo murino.	110
Figura 42. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Pho4 de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	112
Figura 43. Sensibilidad a cloruro sódico del mutante <i>pho4</i>	113
Figura 44. Cinética de activación de las MAP quinasas en presencia de NaCl en el mutante <i>pho4</i>	114

Figura 45. Movilidad de la proteína de fusión Pho4-myc en presencia de cloruro sódico.	115
Figura 46. Crecimiento del mutante <i>pho4</i> en presencia de estrés oxidativo.....	116
Figura 47. Cinética de activación por compuestos oxidantes en mutantes <i>pho4</i>	117
Figura 48. Cinética de viabilidad del mutante <i>pho4</i> frente a estrés nitrosativo.	119
Figura 49. Estructuras moleculares del fosfato y el arseniato.....	121
Figura 50. Susceptibilidad del mutante <i>pho4</i> a arseniato sódico (As (V)).....	122
Figura 51. Cinética de activación de MAP quinasas en distintos fondos genéticos.....	123
Figura 52. Patrón de fosforilación de Hog1 y Mkc1 en presencia de As (V).	124
Figura 53. Elementos de la ruta HOG y de la ruta PKC en respuesta a As (V).	125
Figura 54. Niveles de fosforilación de las MAP quinasas en función de la presencia/ausencia de fosfato en el medio.....	126
Figura 55. Inducción de <i>PHO4^{pr}-CbLUC</i> en presencia de arseniato y fosfato.	128
Figura 56. La cinética de activación de MAPKs frente a arseniato sódico y movilidad electroforética de Pho4-myc.	129
Figura 57. Inducción relativa de la expresión de <i>PHO4^{pr}-CbLUC</i> en respuesta a arseniato sódico.	130
Figura 58. Respuesta de la delección de <i>PHO4</i> frente arsenito sódico en <i>C. albicans</i>	131
Figura 59. Activación de Hog1 y Mkc1 en presencia de arsenito (As (III)).	132
Figura 60. Expresión de <i>PHO4^{pr}-CbLUC</i> en presencia de arsenito.	133
Figura 61. Respuesta de mutantes en elementos de la ruta HOG en presencia de arsenito sódico.	134
Figura 62. Fosforilación de Hog1 en un mutante <i>ssk1</i> en respuesta a arsenito.	135
Figura 63. Fosforilación de Hog1 en respuesta a arsenito en distintos mutantes de señalización.	136
Figura 64. Cuantificación de ROS producido por compuestos inorgánicos de arsénico y variación en el potencial de membrana mitocondrial.	138
Figura 65. Cuantificación de ROS en presencia de arseniato y arsenito en <i>C. albicans</i>	140
Figura 66. Efecto del O ₂ y CO ₂ en la sensibilidad a diversos tipos de estrés.	142
Figura 67. Crecimiento del mutante <i>pho4</i> en presencia de azida sódica.....	144
Figura 68. Curvas de crecimiento de las cepas ensayadas en medio definido SD y SG.	145
Figura 69. Efecto del inhibidor de la oxidasa alternativa en el crecimiento del mutante <i>pho4</i>	146

Lista de Figuras

Figura 70. Comportamiento del mutante <i>pho4</i> en respuesta a arseniato en medio YPG.	147
Figura 71. Respuesta de la delección de <i>PHO4</i> en la presencia conjunta de arseniato con inhibidores de la respiración.....	148
Figura 72. Cuantificación del potencial de membrana en presencia de azida sódica.	150
Figura 73. Nivel de colonización del tracto gastrointestinal de ratón por un mutante <i>pho4</i>	151
Figura 74. Presencia de <i>pho4</i> -dTOM2 en distintas porciones del tracto intestinal.....	152
Figura 75. Resistencia de <i>pho4</i> a la presencia de sales biliares.....	153
Figura 76. Capacidad de colonización del mutante <i>pho4</i> en competición con su parental.	154
Figura 77. Presencia de la cepa parental y el mutante <i>pho4</i> en el lumen intestinal.....	155
Figura 78. Crecimiento de cultivos mixtos de la cepa parental y del mutante <i>pho4</i>	157
Figura 79. Viabilidad del mutante <i>pho4</i> frente a GSNO en un cultivo mixto.....	158
Figura 80. Adhesión de los mutantes <i>pho4</i> y <i>sko1</i> a la mucosa intestinal.	159
Figura 81. Modelo de los papeles desempeñados por el factor de transcripción Sko1 en <i>C. albicans</i>	171
Figura 82. Modelo de la actuación del factor de transcripción Pho4 en <i>C. albicans</i>	174
Figura 83. Representación esquemática de la señalización de la presencia de arseniato y arsenito.	178
Figura 84. Construcción del plásmido pNIM1R- <i>PHO4</i> -myc y comprobación de la reintegración.	193
Figura 85. Sensibilidad/resistencia de mutantes de <i>C. albicans</i> alterados en factores de transcripción a agentes causantes de estrés.	199

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño del diámetro de halo de inhibición de crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno y menadiona a diferentes dosis.....	72
Tabla 2. Genes cuya expresión se encuentra alterada en un mutante <i>sko1</i> en condiciones basales.	78
Tabla 3. Genes cuya expresión está alterada en un mutante <i>sko1</i> en condiciones de estrés oxidativo.....	83
Tabla 4. Mutantes en factores de transcripción que muestran fenotipos de sensibilidad frente a los agentes o condiciones ensayados.	101
Tabla 5. Relación de cepas empleadas: genotipos y origen.....	190
Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	191
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.	192
Tabla 8. Medios de cultivo utilizados.	197
Tabla 9. Compuestos adicionales empleados en este trabajo.....	197
Tabla 10. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas	206

BIBLIOGRAFÍA

Reference List

- Akins,R.A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**: 285-318.
- Alarco,A.M., and Raymond,M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 700-708.
- Alonso-Monge,R., Román,E., Nombela,C., and Pla,J. (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiol* **152**: 905-912.
- Alonso-Monge,R., Carvailho,S., Nombela,C., Rial,E., and Pla,J. (2009) The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiol* **155**: 413-423.
- Alonso-Monge,R., Navarro-García,F., Molero,G., Diez-Orejas,R., Gustin,M., Pla,J. *et al.* (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 3058-3068.
- Alonso-Monge,R., Navarro-García,F., Román,E., Negredo,A.I., Eisman,B., Nombela,C., and Pla,J. (2003) The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Essential in the Oxidative Stress Response and Chlamydospore Formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 351-361.
- Alonso-Monge,R., Román,E., Arana,D.M., Prieto,D., Urrialde,V., Nombela,C., and Pla,J. (2010) The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 587-601.
- Arana,D.M., Alonso-Monge,R., Du,C., Calderone,R., and Pla,J. (2007) Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol* **9**: 1647-1659.
- Arana,D.M., Nombela,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2005) The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 1033-1049.
- Bahn,Y.S., and Sundstrom,P. (2001) *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**: 3211-3223.
- Banuett,F. (1998) Signalling in the yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 249-274.
- Barelle,C.J., Priest,C.L., MacCallum,D.M., Gow,N.A., Odds,F.C., and Brown,A.J. (2006) Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8**: 961-971.

Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002) *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**: 918-930.

Bockmuhl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A., and Ernst, J.F. (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**: 1243-1257.

Bouganim, N., David, J., Wysocki, R., and Ramotar, D. (2001) Yap1 overproduction restores arsenite resistance to the ABC transporter deficient mutant *ycf1* by activating ACR3 expression. *Biochem Cell Biol* **79**: 441-448.

Brennan, M., Thomas, D., Whiteway, M., and Kavanagh, K. (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**: 153.

Brown, A.J., Brown, G.D., Netea, M.G., and Gow, N.A. (2014) Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol* **22**: 614-622.

Buffo, J., Herman, M.A., and Soll, D.R. (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**: 21-30.

Calera, J.A., Herman, D., and Calderone, R. (2000a) Identification of *YPD1*, a gene of *Candida albicans* which encodes a two-component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast* **16**: 1053-1059.

Calera, J.A., Zhao, X.J., and Calderone, R. (2000b) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 518-525.

Cao, F., Lane, S., Raniga, P.P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K. *et al.* (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 295-307.

Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L., and Cantore, M.L. (2004) *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot Cell* **3**: 190-199.

Chauhan, N., Inglis, D., Román, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R. (2003) *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **2**: 1018-1024.

Chaves, G.M., Bates, S., MacCallum, D.M., and Odds, F.C. (2007) *Candida albicans* *GRX2*, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genet Mol Res* **6**: 1051-1063.

Cheetham, J., Smith, D.A., da Silva, D.A., Doris, K.S., Patterson, M.J., Bruce, C.R., and Quinn, J. (2007) A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **18**: 4603-4614.

- Cheng,G., Wozniak,K., Wallig,M.A., Fidel,P.L., Jr., Trupin,S.R., and Hoyer,L.L. (2005) Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun* **73**: 1656-1663.
- Cloutier,M., Castilla,R., Bolduc,N., Zelada,A., Martineau,P., Bouillon,M. *et al.* (2003) The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **38**: 133-141.
- Cornet,M., and Gaillardin,C. (2014) pH signaling in human fungal pathogens: a new target for antifungal strategies. *Eukaryot Cell* **13**: 342-352.
- Cowan,K.J., and Storey,K.B. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**: 1107-1115.
- Csank,C., Makris,C., Meloche,S., Schröppel,K., Röllinghoff,M., Dignard,D. *et al.* (1997) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 Family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **8**: 2539-2551.
- Csank,C., Schröppel,K., Leberer,E., Harcus,D., Mohamed,O., Meloche,S. *et al.* (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**: 2713-2721.
- da Silva,D.A., Patterson,M.J., Smith,D.A., MacCallum,D.M., Erwig,L.P., Morgan,B.A., and Quinn,J. (2010) Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **30**: 4550-4563.
- Dantas,A.S., Day,A., Ikeh,M., Kos,I., Achan,B., and Quinn,J. (2015) Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* **5**: 142-165.
- Davis,D., Edwards,J.E., Jr., Mitchell,A.P., and Ibrahim,A.S. (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* **68**: 5953-5959.
- de Nadal,E., Alepuz,P.M., and Posas,F. (2002) Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**: 735-740.
- Deveau,A., Piispanen,A.E., Jackson,A.A., and Hogan,D.A. (2010) Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell* **9**: 569-577.
- Diaz,G., Liu,S., Isola,R., Diana,A., and Falchi,A.M. (2003) Mitochondrial localization of reactive oxygen species by dihydrofluorescein probes. *Histochem Cell Biol* **120**: 319-325.
- Diez-Orejas,R., Molero,G., Navarro-Garcia,F., Pla,J., Nombela,C., and Sanchez-Perez,M. (1997) Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun* **65**: 833-837.
- Dubin,A., and Estenssoro,E. (2008) Mechanisms of tissue hypercarbia in sepsis. *Front Biosci* **13**: 1340-1351.

Dujardin,L., Walbaum,S., and Biguet,J. (1980) [Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydoconidia in synthetic culture media]. *Mycopathologia* **71**: 113-118.

Eisman,B., Alonso-Monge,R., Román,E., Arana,D., Nombela,C., and Pla,J. (2006) The Cek1 and Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinases Play Complementary Roles in Cell Wall Biogenesis and Chlamydoconidium Formation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 347-358.

Ene,I.V., Adya,A.K., Wehmeier,S., Brand,A.C., MacCallum,D.M., Gow,N.A., and Brown,A.J. (2012) Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **14**: 1319-1335.

Enjalbert,B., MacCallum,D.M., Odds,F.C., and Brown,A.J. (2007) Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 2143-2151.

Enjalbert,B., Nantel,A., and Whiteway,M. (2003) Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14**: 1460-1467.

Enjalbert,B., Smith,D.A., Cornell,M.J., Alam,I., Nicholls,S., Brown,A.J., and Quinn,J. (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.

EPINE (2006) Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España. EPINE 1990-2006:17 años. www.vhebron.es/ac/preventiva/epine/6_epine_1990_2006.pdf.

Erecinska,M., and Silver,I.A. (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* **128**: 263-276.

Fanning,S., and Mitchell,A.P. (2012) Fungal biofilms. *PLoS Pathog* **8**: e1002585.

Filler,S.G. (2013) Can host receptors for fungi be targeted for treatment of fungal infections? *Trends Microbiol* **21**: 389-396.

Finkel,J.S., and Mitchell,A.P. (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **9**: 109-118.

Fleck,C.B., Schobel,F., and Brock,M. (2011) Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol* **301**: 400-407.

Flint,D.H., Tuminello,J.F., and Emptage,M.H. (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* **268**: 22369-22376.

Fonzi,W.A., and Irwin,M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.

Frohner,I.E., Bourgeois,C., Yatsyk,K., Majer,O., and Kuchler,K. (2009) *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* **71**: 240-252.

- Fuchs,B.B., O'Brien,E., Khoury,J.B., and Mylonakis,E. (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **1**: 475-482.
- Gacser,A., Stehr,F., Kroger,C., Kredics,L., Schafer,W., and Nosanchuk,J.D. (2007) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 4710-4718.
- Ganguly,S., and Mitchell,A.P. (2011) Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **14**: 380-385.
- Garcia,M.G., O'Connor,J.E., Garcia,L.L., Martinez,S.I., Herrero,E., and del Castillo,A.L. (2001) Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to *URA3*, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae aft1* mutation. *Yeast* **18**: 301-311.
- Garcia,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Rodriguez-Pena,J.M., Francois,J. *et al.* (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183-15195.
- Ghosh,M., Shen,J., and Rosen,B.P. (1999) Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5001-5006.
- Giacometti,R., Kronberg,F., Biondi,R.M., and Passeron,S. (2009) Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage. *Yeast* **26**: 273-285.
- Gimeno,C.J., Ljungdahl,P.O., Styles,C.A., and Fink,G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.
- Gow,N.A., van,d., V, Brown,A.J., and Netea,M.G. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**: 112-122.
- Grahl,N., Shepardson,K.M., Chung,D., and Cramer,R.A. (2012) Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? *Eukaryot Cell* **11**: 560-570.
- Guan,G., Xie,J., Tao,L., Nobile,C.J., Sun,Y., Cao,C. *et al.* (2013) Bcr1 plays a central role in the regulation of opaque cell filamentation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **89**: 732-750.
- Halliwell,B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**: 312-322.
- Hanahan,D. (1988) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning. Glover,D.M. (ed). Oxford: IRL Press, pp. 109-135.
- Herrero de Dios C., Román,E., Dias,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2013) The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **50**: 21-32.

Herrero de Dios,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2014) The lack of upstream elements of the Cek1 and Hog1 mediated pathways leads to a synthetic lethal phenotype upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **69**: 31-42.

Herrero de,D.C., Roman,E., Diez,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2013) The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **50**: 21-32.

Herrero,E., Ros,J., Belli,G., and CabiscoI,E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1217-1235.

Herskowitz,I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**: 187-197.

Hida,N., Awais,M., Takeuchi,M., Ueno,N., Tashiro,M., Takagi,C. *et al.* (2009) High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases. *PLoS One* **4**: e5868.

Hohmann,S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.

Homann,O.R., Dea,J., Noble,S.M., and Johnson,A.D. (2009) A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS Genet* **5**: e1000783.

Huang,G., Wang,H., Chou,S., Nie,X., Chen,J., and Liu,H. (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12813-12818.

Huang,R.N., and Lee,T.C. (1996) Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. *Toxicol Appl Pharmacol* **136**: 243-249.

Hube,B., Stehr,F., Bossenz,M., Mazur,A., Kretschmar,M., and Schafer,W. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* **174**: 362-374.

Hwang,C.S., Baek,Y.U., Yim,H.S., and Kang,S.O. (2003) Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 929-941.

Hwang,C.S., Rhie,G.E., Oh,J.H., Huh,W.K., Yim,H.S., and Kang,S.O. (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiol* **148**: 3705-3713.

IARC (1987) Summaries & evaluations: Arsenic and arsenic compounds (Group 1). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Supplement 7)*.

Inglis,D.O., Arnaud,M.B., Binkley,J., Shah,P., Skrzypek,M.S., Wymore,F. *et al.* (2012) The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res* **40**: D667-D674.

- Jain,C., Pastor,K., Gonzalez,A.Y., Lorenz,M.C., and Rao,R.P. (2013) The role of *Candida albicans* AP-1 protein against host derived ROS in *in vivo* models of infection. *Virulence* **4**: 67-76.
- Kaffman,A., Herskowitz,I., Tjian,R., and O'Shea,E.K. (1994) Phosphorylation of the transcription factor *PHO4* by a cyclin- CDK complex, *PHO80-PHO85*. *Science* **263**: 1153-1156.
- Kang,S., and Metzenberg,R.L. (1990) Molecular analysis of *nuc-1+*, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* **10**: 5839-5848.
- Kerwin,C.L., and Wykoff,D.D. (2009) *Candida glabrata PHO4* is necessary and sufficient for Pho2-independent transcription of phosphate starvation genes. *Genetics* **182**: 471-479.
- Kinneberg,K.M., Bendel,C.M., Jechorek,R.P., Cebelinski,E.A., Gale,C.A., Berman,J.G. *et al.* (1999) Effect of *INT1* gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization. *J Surg Res* **87**: 245-251.
- Koh,A.Y., Kohler,J.R., Coggshall,K.T., Van,R.N., and Pier,G.B. (2008) Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* **4**: e35.
- Köhler,G.A., White,T.C., and Agabian,N. (1997) Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* **179**: 2331-2338.
- Komeili,A., and O'Shea,E.K. (1999a) Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**: 977-980.
- Komeili,A., and O'Shea,E.K. (1999b) Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**: 977-980.
- Kultz,D. (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* **46**: 571-588.
- Kumamoto,C.A. (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5576-5581.
- Kvaal,C.A., Srikantha,T., and Soll,D.R. (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**: 4468-4475.
- Kwon,M.S., Lim,S.W., and Kwon,H.M. (2009) Hypertonic stress in the kidney: a necessary evil. *Physiology (Bethesda)* **24**: 186-191.
- Lan,C.Y., Newport,G., Murillo,L.A., Jones,T., Scherer,S., Davis,R.W., and Agabian,N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14907-14912.
- Leach,M.D., and Cowen,L.E. (2013) Surviving the heat of the moment: a fungal pathogens perspective. *PLoS Pathog* **9**: e1003163.

- Leidich,S.D., Ibrahim,A.S., Fu,Y., Koul,A., Jessup,C., Vitullo,J. *et al.* (1998) Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 26078-26086.
- Li,D., Gurkovska,V., Sheridan,M., Calderone,R., and Chauhan,N. (2004) Studies on the regulation of the two-component histidine kinase gene *CHK1* in *Candida albicans* using the heterologous *lacZ* reporter gene. *Microbiol* **150**: 3305-3313.
- Lim,C.S., Rosli,R., Seow,H.F., and Chong,P.P. (2012) *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**: 21-31.
- Litwin,I., Bocer,T., Dziadkowiec,D., and Wysocki,R. (2013) Oxidative stress and replication-independent DNA breakage induced by arsenic in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **9**: e1003640.
- Liu,H. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 728-735.
- Liu,H., Köhler,J., and Fink,G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723-1726.
- Liu,S.X., Athar,M., Lippai,I., Waldren,C., and Hei,T.K. (2001) Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1643-1648.
- Liu,Y., and Filler,S.G. (2011) *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* **10**: 168-173.
- Liu,Z., Shen,J., Carbrey,J.M., Mukhopadhyay,R., Agre,P., and Rosen,B.P. (2002) Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6053-6058.
- Livak,K.J., and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lopez,C.M., Wallich,R., Riesbeck,K., Skerka,C., and Zipfel,P.F. (2014) *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. *PLoS One* **9**: e90796.
- Lorenz,M.C., Bender,J.A., and Fink,G.R. (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**: 1076-1087.
- Lu,K., Abo,R.P., Schlieper,K.A., Graffam,M.E., Levine,S., Wishnok,J.S. *et al.* (2014a) Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: an integrated metagenomics and metabolomics analysis. *Environ Health Perspect* **122**: 284-291.
- Lu,K., Cable,P.H., Abo,R.P., Ru,H., Graffam,M.E., Schlieper,K.A. *et al.* (2013) Gut microbiome perturbations induced by bacterial infection affect arsenic biotransformation. *Chem Res Toxicol* **26**: 1893-1903.

- Lu,K., Mahbub,R., Cable,P.H., Ru,H., Parry,N.M., Bodnar,W.M. *et al.* (2014b) Gut microbiome phenotypes driven by host genetics affect arsenic metabolism. *Chem Res Toxicol* **27**: 172-174.
- Maciaszczyk-Dziubinska,E., Migdal,I., Migocka,M., Bocer,T., and Wysocki,R. (2010) The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Lett* **584**: 726-732.
- Maeda,T., Wurgler-Murphy,S.M., and Saito,H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-245.
- Marotta,D.H., Nantel,A., Sukala,L., Teubl,J.R., and Rauceo,J.M. (2013) Genome-wide transcriptional profiling and enrichment mapping reveal divergent and conserved roles of Sko1 in the *Candida albicans* osmotic stress response. *Genomics* **102**: 363-371.
- Martchenko,M., Alarco,A.M., Marcus,D., and Whiteway,M. (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15**: 456-467.
- Martin,H., Rodriguez-Pachon,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., and Molina,M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.
- Martin,J.L. (1995) Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* **3**: 245-250.
- Matia-Gonzalez,A.M., and Rodriguez-Gabriel,M.A. (2011) Slt2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast* **28**: 9-17.
- Mavrianos,J., Desai,C., and Chauhan,N. (2014) Two-component histidine phosphotransfer protein Ypd1 is not essential for viability in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **13**: 452-460.
- Mayer,F.L., Wilson,D., Jacobsen,I.D., Miramon,P., Slesiona,S., Bohovych,I.M. *et al.* (2012) Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. *PLoS One* **7**: e38584.
- Menezes,R.A., Amaral,C., Batista-Nascimento,L., Santos,C., Ferreira,R.B., Devaux,F. *et al.* (2008) Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. *Biochem J* **414**: 301-311.
- Menon,V., Li,D., Chauhan,N., Rajnarayanan,R., Dubrovskaya,A., West,A.H., and Calderone,R. (2006) Functional studies of the Ssk1p response regulator protein of *Candida albicans* as determined by phenotypic analysis of receiver domain point mutants. *Mol Microbiol* **62**: 997-1013.
- Montazeri,M., and Hedrick,H.G. (1984) Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl Environ Microbiol* **47**: 1341-1342.
- Morano,K.A., Grant,C.M., and Moye-Rowley,W.S. (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**: 1157-1195.
- Mukhopadhyay,R., Shi,J., and Rosen,B.P. (2000) Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* **275**: 21149-21157.

Murciano,C., Moyes,D.L., Runglall,M., Tobouti,P., Islam,A., Hoyer,L.L., and Naglik,J.R. (2012) Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One* **7**: e33362.

Naglik,J.R., Challacombe,S.J., and Hube,B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-28, table.

Naglik,J.R., Moyes,D.L., Wachtler,B., and Hube,B. (2011) *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* **13**: 963-976.

Nakagawa,Y., Kanbe,T., and Mizuguchi,I. (2003) Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* **47**: 395-403.

Navarro-García,F., Alonso-Monge,R., Rico,H., Pla,J., Sentandreu,R., and Nombela,C. (1998) A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiol* **144**: 411-424.

Navarro-García,F., Eisman,B., Fiuza,S.M., Nombela,C., and Pla,J. (2005) The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 2737-2749.

Navarro-García,F., Sánchez,M., Pla,J., and Nombela,C. (1995) Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**: 2197-2206.

Negredo,A., Monteoliva,L., Gil,C., Pla,J., and Nombela,C. (1997) Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiol* **143**: 297-302.

Nicholls,S., MacCallum,D.M., Kaffarnik,F.A., Selway,L., Peck,S.C., and Brown,A.J. (2011) Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **48**: 297-305.

Nikawa,H., Nishimura,H., Hamada,T., Makihiro,S., and Samaranayake,L.P. (1998) Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation in vitro. *Mycopathologia* **144**: 125-129.

Nobile,C.J., Nett,J.E., Andes,D.R., and Mitchell,A.P. (2006) Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* **5**: 1604-1610.

Nobile,C.J., Schneider,H.A., Nett,J.E., Sheppard,D.C., Filler,S.G., Andes,D.R., and Mitchell,A.P. (2008a) Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* **18**: 1017-1024.

Nobile,C.J., Solis,N., Myers,C.L., Fay,A.J., Deneault,J.S., Nantel,A. *et al.* (2008b) *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol* **10**: 2180-2196.

O'Neill,E.M., Kaffman,A., Jolly,E.R., and O'Shea,E.K. (1996) Regulation of Pho4 nuclear localization by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**: 209-212.

- Pascual-Ahuir, A., Posas, F., Serrano, R., and Proft, M. (2001) Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem* **276**: 37373-37378.
- Patterson, M.J., McKenzie, C.G., Smith, D.A., da Silva, D.A., Sherston, S., Veal, E.A. *et al.* (2013) Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape. *Antioxid Redox Signal* **19**: 2244-2260.
- Peman, J., Canton, E., Minana, J.J., Florez, J.A., Echeverria, J., Ortega, D.N. *et al.* (2011) [Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study]. *Rev Iberoam Micol* **28**: 91-99.
- Peman, J., Zaragoza, R., and Salavert, M. (2013) Prevention and control of nosocomial and health-care facilities associated infections caused by species of *Candida* and other yeasts. *Rev Esp Quimioter* **26**: 298-311.
- Perlroth, J., Choi, B., and Spellberg, B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* **45**: 321-346.
- Pfaller, M.A., Andes, D.R., Diekema, D.J., Horn, D.L., Reboli, A.C., Rotstein, C. *et al.* (2014) Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* **9**: e101510.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Pinyayev, T.S., Kohan, M.J., Herbin-Davis, K., Creed, J.T., and Thomas, D.J. (2011) Preabsorptive metabolism of sodium arsenate by anaerobic microbiota of mouse cecum forms a variety of methylated and thiolated arsenicals. *Chem Res Toxicol* **24**: 475-477.
- Poltermann, S., Kunert, A., von der, H.M., Eck, R., Hartmann, A., and Zipfel, P.F. (2007) Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **282**: 37537-37544.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., and Ariño, J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249-17255.
- Posas, F., and Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.
- Potera, C. (2014) Clues to arsenic's toxicity: microbiome alterations in the mouse gut. *Environ Health Perspect* **122**: A82.
- Prieto, D., Roman, E., Correia, I., and Pla, J. (2014) The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PLoS One* **9**: e87128.

Proft,M., Gibbons,F.D., Copeland,M., Roth,F.P., and Struhl,K. (2005) Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1343-1352.

Proft,M., Pascual-Ahuir,A., de Nadal,E., Ariño,J., Serrano,R., and Posas,F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123-1133.

Proft,M., and Serrano,R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG- dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**: 537-546.

Proft,M., and Struhl,K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307-1317.

Pukkila-Worley,R., Peleg,A.Y., Tampakakis,E., and Mylonakis,E. (2009) *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryot Cell* **8**: 1750-1758.

Puri,S., Kumar,R., Chadha,S., Tati,S., Conti,H.R., Hube,B. *et al.* (2012) Secreted Aspartic Protease Cleavage of *Candida albicans* Msb2 Activates Cek1 MAPK Signaling Affecting Biofilm Formation and Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS One* **7**: e46020.

Ramirez-Zavala,B., Mogavero,S., Scholler,E., Sasse,C., Rogers,P.D., and Morschhauser,J. (2014) SAGA/ADA complex subunit Ada2 is required for Cap1- but not Mrr1-mediated upregulation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump *MDR1*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 5102-5110.

Rauceo,J.M., Blankenship,J.R., Fanning,S., Hamaker,J.J., Deneault,J.S., Smith,F.J. *et al.* (2008) Regulation of the *Candida albicans* Cell Wall Damage Response by Transcription Factor Sko1 and PAS Kinase Psk1. *Mol Biol Cell*.

Rep,M., Proft,M., Remize,F., Tamas,M., Serrano,R., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* **40**: 1067-1083.

Reuss,O., Vik,A., Kolter,R., and Morschhauser,J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341:119-27.**: 119-127.

Richter,K., Haslbeck,M., and Buchner,J. (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* **40**: 253-266.

Rogers,P.D., and Barker,K.S. (2002) Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3412-3417.

Rogers,P.D., and Barker,K.S. (2003) Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1220-1227.

- Román,E., Alonso-Monge,R., Gong,Q., Li,D., Calderone,R., and Pla,J. (2009a) The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **9**: 942-955.
- Román,E., Arana,D.M., Nombela,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2007) MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* **15**: 181-190.
- Román,E., Cottier,F., Ernst,J.F., and Pla,J. (2009b) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.
- Román,E., Nombela,C., and Pla,J. (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**: 10611-10627.
- Romanowski,K., Zaborin,A., Valuckaite,V., Rolfes,R.J., Babrowski,T., Bethel,C. *et al.* (2012) *Candida albicans* isolates from the gut of critically ill patients respond to phosphate limitation by expressing filaments and a lethal phenotype. *PLoS One* **7**: e30119.
- Roncero,C., Valdivieso,M.H., Ribas,J.C., and Durán,A. (1988) Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**: 1945-1949.
- Rosen,B.P. (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* **529**: 86-92.
- Rosen,B.P., and Liu,Z. (2009) Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ Int* **35**: 512-515.
- Salgado,A., Lopez-Serrano,O.A., Matia-Gonzalez,A.M., Sotelo,J., Zarco-Fernandez,S., Munoz-Olivas,R. *et al.* (2012) Response to arsenate treatment in *Schizosaccharomyces pombe* and the role of its arsenate reductase activity. *PLoS One* **7**: e43208.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San José C., Monge,R.A., Perez-Díaz,R., Pla,J., and Nombela,C. (1996) The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 5850-5852.
- Sanders,O.I., Rensing,C., Kuroda,M., Mitra,B., and Rosen,B.P. (1997) Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 3365-3367.
- Saville,S.P., Lazzell,A.L., Monteagudo,C., and Lopez-Ribot,J.L. (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **2**: 1053-1060.
- Schaller,M., Borelli,C., Korting,H.C., and Hube,B. (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**: 365-377.
- Schroppel,K., Srikantha,T., Wessels,D., DeCock,M., Lockhart,S.R., and Soll,D.R. (1996) Cytoplasmic localization of the white phase-specific *WH11* gene product of *Candida albicans*. *Microbiol* **142** (Pt 8): 2245-2254.

- Singh,P., Chauhan,N., Ghosh,A., Dixon,F., and Calderone,R. (2004) *SKN7* of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* **72**: 2390-2394.
- Slutsky,B., Staebell,M., Anderson,J., Risen,L., Pfaller,M., and Soll,D.R. (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197.
- Smith,D.A., Nicholls,S., Morgan,B.A., Brown,A.J., and Quinn,J. (2004) A Conserved Stress-activated Protein Kinase Regulates a Core Stress Response in the Human Pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 4179-4190.
- Soll,D.R. (1986) The regulation of cellular differentiation in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *BioEssays* **5**: 5-11.
- Soll,D.R., Lockhart,S.R., and Zhao,R. (2003) Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 390-397.
- Sonneborn,A., Bockmuhl,D.P., Gerads,M., Kurpanek,K., Sanglard,D., and Ernst,J.F. (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**: 386-396.
- Srikantha,T., Klapach,A., Lorenz,W.W., Tsai,L.K., Laughlin,L.A., Gorman,J.A., and Soll,D.R. (1996) The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 121-129.
- Srinivasa,K., Kim,N.R., Kim,J., Kim,M., Bae,J.Y., Jeong,W. *et al.* (2012) Characterization of a putative thioredoxin peroxidase *Prx1* of *Candida albicans*. *Mol Cells* **33**: 301-307.
- Staab,J.F., Bradway,S.D., Fidel,P.L., and Sundstrom,P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* *Hwp1*. *Science* **283**: 1535-1538.
- Stadtman,E.R., and Levine,R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**: 207-218.
- Sudbery,P., Gow,N., and Berman,J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- Sudbery,P.E. (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**: 737-748.
- Sun,J.N., Solis,N.V., Phan,Q.T., Bajwa,J.S., Kashleva,H., Thompson,A. *et al.* (2010) Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* *Ssa1*. *PLoS Pathog* **6**: e1001181.
- Tapio,S., and Grosche,B. (2006) Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* **612**: 215-246.
- Tebarth,B., Doedt,T., Krishnamurthy,S., Weide,M., Monterola,F., Dominguez,A., and Ernst,J.F. (2003) Adaptation of the *Efg1p* morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *J Mol Biol* **20;329**: 949-962.
- Theiss,S., Ishdorj,G., Brenot,A., Kretschmar,M., Lan,C.Y., Nichterlein,T. *et al.* (2006) Inactivation of the phospholipase B gene *PLB5* in wild-type *Candida albicans* reduces cell-

associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol* **296**: 405-420.

Thewes,S., Kretschmar,M., Park,H., Schaller,M., Filler,S.G., and Hube,B. (2007) In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol Microbiol* **63**: 1606-1628.

Thomas,E., Roman,E., Claypool,S., Manzoor,N., Pla,J., and Panwar,S.L. (2013) Mitochondria influence *CDR1* efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 5580-5599.

Thorsen,M., Di,Y., Tangemo,C., Morillas,M., Ahmadpour,D., Van der Does,C. *et al.* (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 4400-4410.

Thorsen,M., Lagniel,G., Kristiansson,E., Junot,C., Nerman,O., Labarre,J., and Tamas,M.J. (2007) Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol Genomics* **30**: 35-43.

Urban,C., Xiong,X., Sohn,K., Schroppel,K., Brunner,H., and Rupp,S. (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **57**: 1318-1341.

Urrialde,V., Prieto,D., Pla,J., and Alonso-Monge,R. (2015) The Pho4 transcription factor mediates the response to arsenate and arsenite in *Candida albicans*. *Front Microbiol* **6**: 118.

Valles,J., Calbo,E., Anoro,E., Fontanals,D., Xercavins,M., Espejo,E. *et al.* (2008) Bloodstream infections in adults: importance of healthcare-associated infections. *J Infect* **56**: 27-34.

Vandeputte,P., Pradervand,S., Ischer,F., Coste,A.T., Ferrari,S., Harshman,K., and Sanglard,D. (2012) Identification and functional characterization of Rca1, a transcription factor involved in both antifungal susceptibility and host response in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**: 916-931.

Varela,J.C.S., Praekelt,U.M., Meacock,P.A., Planta,R.J., and Mager,W.H. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* *HSP12* gene is activated by the high- osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol* **15**: 6232-6245.

Villa-Bellosta,R., and Sorribas,V. (2008) Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**: 125-134.

Vincent,J.L., Rello,J., Marshall,J., Silva,E., Anzueto,A., Martin,C.D. *et al.* (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**: 2323-2329.

Vylkova,S., Carman,A.J., Danhof,H.A., Collette,J.R., Zhou,H., and Lorenz,M.C. (2011) The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio* **2**: e00055-11.

- Wachtler,B., Wilson,D., Haedicke,K., Dalle,F., and Hube,B. (2011) From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* **6**: e17046.
- Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180.
- Wilson,D., Tutulan-Cunita,A., Jung,W., Hauser,N.C., Hernandez,R., Williamson,T. *et al.* (2007) Deletion of the high-affinity cAMP phosphodiesterase encoded by *PDE2* affects stress responses and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **65**: 841-856.
- Wysocki,R., Bobrowicz,P., and Ulaszewski,S. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* *ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* **272**: 30061-30066.
- Wysocki,R., Chery,C.C., Wawrzycka,D., Van,H.M., Cornelis,R., Thevelein,J.M., and Tamas,M.J. (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **40**: 1391-1401.
- Wysocki,R., and Tamas,M.J. (2010) How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 925-951.
- Wysong,D.R., Christin,L., Sugar,A.M., Robbins,P.W., and Diamond,R.D. (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* **66**: 1953-1961.
- Xie,Z., Thompson,A., Sobue,T., Kashleva,H., Xu,H., Vasilakos,J., and Dongari-Bagtzoglou,A. (2012) *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *J Infect Dis* **206**: 1936-1945.
- Yuan,X., Mitchell,B.M., Hua,X., Davis,D.A., and Wilhelmus,K.R. (2010) The RIM101 signal transduction pathway regulates *Candida albicans* virulence during experimental keratomycosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 4668-4676.
- Zhang,X., De Micheli,M., Coleman,S.T., Sanglard,D., and Moye-Rowley,W.S. (2000) Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol* **36**: 618-629.
- Zhi,H., Tang,L., Xia,Y., and Zhang,J. (2013) Ssk1p-independent activation of Ssk2p plays an important role in the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: alternative activation of Ssk2p in osmotic stress. *PLoS One* **8**: e54867.
- Znaldi,S., Barker,K.S., Weber,S., Alarco,A.M., Liu,T.T., Boucher,G. *et al.* (2009) Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot Cell* **8**: 806-820.

ANEXOS

1. Anexo I: Tablas de la respuesta transcripcional de Sko1

Tabla 1: Ratio de la expresión de genes en un mutante *sko1* en comparación con la cepa silvestre tras 10 minutos de tratamiento con 5 mM de peróxido de hidrógeno. En rojo se muestran aquellos genes activados (ratio ≥ 2) y en verde aquellos que se encuentran reprimidos (ratio ≤ 0.5).

NOMBRE	CGDID/ GENEID	FUNCIÓN	SKO1 10' VS CAF2 10'
WH11	CAF0006989	Cytoplasmic protein expressed specifically in white phase yeast-form cells; expression in opaque cells increases virulence and frequency of opaque-to-white switching; null mutant shows wild-type switching; similar to <i>S. cerevisiae</i> Hsp12p	42,85
ALS2	CAL0001283	ALS family protein; role in adhesion, biofilm formation, wild-type germ tube induction; expressed during infection of human buccal epithelial cells, not under laboratory growth conditions; ALS family includes cell-surface glycoproteins	8,48
CSP37	CAL0002434	Plasma membrane protein with role in progression of systemic infection in mouse; predicted P-loop, divalent cation binding site, 2 N-glycosylation sites; expressed in yeast and hyphae; hyphal downregulated; no obvious <i>S. cerevisiae</i> homolog	4,29
IPF4065	CAL0001729	Possible stress protein; increased transcription is associated with CDR1 and CDR2 overexpression or fluphenazine treatment; transcription regulated by Sfu1p, Nrg1p, Tup1p	4,25
RNR21	CAL0002245	Protein described as similar to ribonucleoside-diphosphate reductase; regulated by tyrosol and cell density; transcription is upregulated in response to treatment with ciclopirox olamine; fluconazole or flucytosine induced	3,98
DDR48	CAL0004933	Stress-associated protein; expression regulated by multiple filamentous growth pathways; induced by benomyl, or in azole-resistant strain; alkaline downregulated; similar to <i>S. cerevisiae</i> Ddr48p (ATPase/GTPase involved in DNA repair)	3,71
IPF6629	CAL0004253	Putative alkyl hydroperoxide reductase; fluconazole-induced; amphotericin B, caspofungin repressed; alkaline downregulated; regulated by Ssk1p response regulator, Nrg1p, Tup1p, Ssn6p	3,69
IPF12312	CAL0001751	Predicted ORF from Assembly 19; transcriptionally regulated by iron; expression greater in low iron; similar to cell-wall mannoproteins; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> homozygous null mutant than in wild type	3,68
IPF4430	CAF0006969	Gene induced by hypoxia and ketoconazole; oral infection upregulated; mutants have reduced capacity to damage oral epithelial cells	3,23
GLN1	CAL0001010	Protein described as similar to glutamate synthase; regulated by Tsa1p, Tsa1Bp under H ₂ O ₂ stress conditions	3,07
CSH1	CAL0001962	Member of aldo-keto reductase family, similar to aryl alcohol dehydrogenases; role in adhesion to fibronectin, cell surface hydrophobicity; regulated by Ca-upg ₄ erature, growth phase, benomyl, macrophage interaction; azole resistance associated	2,97
IPF19968	CAL0003915	Structural protein of cell wall; 1,3-beta-glucan-linked; has multiple tandem repeats; O-glycosylated by Pmt1p; N-mannosylated; heterozygous mutant has cell wall defects; hyphal-repressed; fluconazole-induced; regulated by iron, Efg1p, Plc1p	2,77
PGA24	CAL0000321	Protein with suggested role in dispersal in host; mutation causes increased adhesion and biofilm formation; putative GPI-anchor; cell wall and secreted; has stable propeptide; regulated by growth phase, phosphate, Ssk1p, Ssn6p, Efg1p, Efh1p	2,52

Anexos

IPF11713.3f	CAL0002039	Predicted ORF from Assembly 19	2,47
IPF6881	CAL0000225	Predicted ORF from Assembly 19; similar to <i>S. cerevisiae</i> Ykr070wp; transposon mutation affects filamentous growth; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	2,31
IPF9191.3f	CAL0002426	Transcriptional activator of drug-responsive genes including CDR1 and CDR2; has Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster; binds DRE element; gene in zinc cluster region near MTL locus; resequencing indicates that TAC1 spans orf19.3188 and orf19.3189	2,26
LSC2	CAL0001726	Putative succinate-CoA ligase beta subunit; regulated by Miq1, Tup1; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cells	2,21
IPF3964	CAL0001097	Transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; amphotericin B induced; similar to cell wall proteins; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> homozygous null mutant than in wild type; regulated by Ssn6p	2,20
IPF17296	CAL0003214	Predicted ORF from Assembly 19	2,18
IPF13836	CAL0000739	Protein described as similar to heat shock proteins; transcription regulated by cAMP, osmotic stress, ciclopirox olamine, ketoconazole; negatively regulated by Cyr1p, Ras1p; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	2,17
IPF3485	CAL0004896	Predicted ORF from Assembly 19	2,15
MDH1	CAL0003583	Predicted malate dehydrogenase	2,11
IFD7	CAL0000951	Protein described as similar to aryl-alcohol dehydrogenases; regulated by Nrg1p, Tup1p; upregulation on benomyl treatment or fluconazole exposure over multiple generations; induction correlates with fluconazole resistance	2,01
GAD1	CAL0002044	Alkaline downregulated; amphotericin B induced	1,98
POX18	CAF0006983	A peroxisomal protein; induced during chlamydospore formation in <i>C. albicans</i>	1,95
ASC1	CAL0000124	Similar to G-beta subunits; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; expression greater at 30 deg than at 37 deg	0,50
RPS20	CAL0001384	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,50
RPL10A	CAL0005037	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,49
IPF946	CAL0000121	Transcription is induced upon filamentous growth; induced by increasing cell density, regulated by tyrosol; hyphally regulated via Cph1p; fluconazole-induced	0,49
DCK1	CAL0002646	Putative guanine nucleotide exchange factor; required for embedded filamentous growth	0,48
IPF19154	CAL0001924	Predicted ORF from Assembly 19	0,48
RPL30.3f	CAF0006997	Protein described as similar to RNA binding proteins; regulated by Nrg1p, Tup1p; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	0,47
PGA4	CAL0004772	Putative cell-surface protein, predicted to carry a glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchor; similar to <i>S. cerevisiae</i> Gas1p; fungal-specific (no human or murine homolog)	0,45
HTS1	CAL0004839	Putative tRNA-His synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,44
RPS3E	CAL0001259	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,43
RPL82	CAL0000666	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,43
IPF9000	CAL0003674	Predicted ORF from Assembly 19	0,43
ILV3	CAL0004803	Putative dihydroxyacid dehydratase; fungal-specific (no human or murine homolog); upregulated in biofilm; <i>S. cerevisiae</i> ortholog is Gcn4p regulated; repressed by nitric oxide	0,42
IPF3370	CAL0004727	Upregulated by Rim101p at acid pH; flucytosine induced; amphotericin B repressed	0,42

IPF1848	CAL0002459	Predicted ORF from Assembly 19; flucytosine induced	0,41
IPF3367	CAL0004725	Putative riboflavin synthase; fungal-specific (no human or murine homolog)	0,41
RAD51	CAL0001214	Predicted ORF from Assembly 19; flucytosine induced	0,41
RPS5	CAL0000989	Predicted ribosomal protein; macrophage/pseudohyphal-induced after 16 h; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,40
RPL35	CAF0007060	Protein described as a ribosomal protein; downregulation correlates with clinical development of fluconazole resistance; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	0,39
RPS7A	CAL0000756	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,39
RPS21	CAL0004119	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,37
RPL21A	CAL0002747	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	0,37
RPN5.3f	CAL0004766	Predicted ORF from Assembly 19; macrophage/pseudohyphal-repressed	0,35
YST1	CAL0000370	Ribosome-associated protein; complements viability of <i>S. cerevisiae</i> yst1 yst2 mutant; similar to laminin-binding proteins, but does not bind laminin; possible S/T phosphorylation, N-glycosylation, myristoylation, Gcn4p-regulated; intron	0,34
PGA36	CAL0001488	Putative GPI-anchored protein of unknown function; alkaline upregulated; greater transcription in hyphal form than yeast form; regulated by Nrg1p, Rfg1p, Tup1p; regulated by Tsa1p, Tsa1Bp in minimal media at 37	0,14
PHR1	CAL0002002	Glycosidase of hyphal cell surface; may act on cell-wall beta-1,3-glucan prior to beta-1,6-glucan linkage; E169 and E270 at active site; role in systemic but not vaginal virulence (neutral, not low pH); high pH or filamentation induced	0,14
-	CAL0001710	Predicted ORF from Assembly 19	0,14
ECE1	CAL0004191	Protein comprising eight 34-residue repeats; expression specific to hyphae, increases with extent of elongation of the cell; downregulated in presence of human blood or PMN; gene is regulated by Rfg1p, Nrg1p, Tup1p, Cph1p, Efg1p, farnesol	0,06

Tabla 2: Ratio de genes expresados tras la adición de peróxido de hidrógeno respecto a su basal del mutante *sko1* con respecto al ratio de genes expresados tras la adición de peróxido de hidrógeno respecto a la expresión basal de la cepa silvestre.

NOMBRE	CGDID/ GENEID	FUNCIÓN	SKO1 10' VS SKO1 BASAL/ CAF2 10' VS CAF2 BASAL
ALS2	CAL0001283	ALS family protein; role in adhesion, biofilm formation, wild-type germ tube induction; expressed during infection of human buccal epithelial cells, not under laboratory growth conditions; ALS family includes cell-surface glycoproteins	5,31
IPF6629	CAL0004253	Putative alkyl hydroperoxide reductase; fluconazole-induced; amphotericin B, caspofungin repressed; alkaline downregulated; regulated by Ssk1p response regulator, Nrg1p, Tup1p, Ssn6p	3,67
PGA24	CAL0000321	Protein with suggested role in dispersal in host; mutation causes increased adhesion and biofilm formation; putative GPI-anchor; cell wall and secreted; has stable propeptide; regulated by growth phase, phosphate, Ssk1p, Ssn6p, Efg1p, Efh1p	2,91

Anexos

ADH1	CAL0003176	Alcohol dehydrogenase, complements <i>S. cerevisiae</i> adh1 adh2 adh3 triple mutation; at surface of yeast-form cells but not hyphae; immunogenic in human or murine infection; regulated by growth phase, carbon source; fluconazole-induced	1,95
ADH5	CAL0003363	Putative alcohol dehydrogenase; expression is regulated upon white-opaque switching; fluconazole-induced; antigenic during murine systemic infection; regulated by Nrg1p, Tup1p	1,95
IPF5118	CAL0002102	Predicted ORF from Assembly 19	1,88
GAD1	CAL0002044	Alkaline downregulated; amphotericin B induced	1,82
YDJ1	CAL0002114	Predicted ORF from Assembly 19; induced during planktonic growth	1,79
IFD7	CAL0000951	Protein described as similar to aryl-alcohol dehydrogenases; regulated by Nrg1p, Tup1p; upregulation on benomyl treatment or fluconazole exposure over multiple generations; induction correlates with fluconazole resistance	1,77
POX18	CAF0006983	A peroxisomal protein; induced during chlamydospore formation in <i>C. albicans</i>	1,77
GPH1	CAL0001970	Putative glycogen phosphorylase; gene regulated by Ssk1p, Mig1p, and Tup1p; fluconazole-induced; localizes to cell surface of hyphal cells, but not yeast-form cells; <i>S. cerevisiae</i> Gph1p is a stress-regulated protein of glycogen metabolism	1,76
IPF7968	CAL0003548	Increased transcription is observed upon benomyl treatment and in populations of cells exposed to fluconazole over multiple generations; regulated by Nrg1p, Tup1p; induced by nitric oxide	1,75
IPF13017	CAL0000965	Predicted ORF from Assembly 19	1,74
IPF17296	CAL0003214	Predicted ORF from Assembly 19	1,73
SNQ2	CAL0001479	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Snq2p transporter; transposon mutation affects filamentous growth; increased transcription is observed upon benomyl treatment	1,66
FAS2.3f	CAL0003358	Alpha subunit of fatty-acid synthase; required for virulence in mouse systemic infection and rat oropharyngeal infection models; regulated by Efg1p; fluconazole-induced; amphotericin B repressed	1,63
HSP104	CAL0001410	Described as a heat shock protein; downregulated in biofilm upon treatment with farnesol; fungal-specific (no human or murine homolog)	1,61
ZMS1	CAL0001620	Predicted ORF from Assembly 19	1,58
LYS7	CAL0001855	Predicted ORF from Assembly 19	1,56
LTP1	CAL0002489	Putative protein phosphatase of the PTP family (tyrosine-specific)	1,55
GCV2	CAL0004920	Putative protein of glycine catabolism; downregulated by Efg1p; upregulated by Rim101p at acid pH	1,54
IPF1636	CAL0003286	Multidrug efflux pump of the plasma membrane; member of the MDR family of the MFS (major facilitator superfamily) of transporters; preferred substrate may be mycophenolic acid; fungal-specific (no human or murine homolog)	1,53
GPX1	CAL0000683	Predicted ORF from Assembly 19	1,53
QDR2	CAL0000412	Predicted ORF from Assembly 19	1,52
ALD5	CAL0002252	Protein described as an aldehyde dehydrogenase; decreased expression in a fluconazole-resistant isolate, or in hyphae; fluconazole-downregulated; protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background	1,52
GPM1	CAL0003574	Protein described as phosphoglycerate mutase; enzyme of glycolysis; antigenic during murine systemic infection; biofilm-, fluconazole-, or amino acid starvation (3-aminotriazole treatment) induced; regulated by Efg1p, Gcn4p	1,51
MMD1	CAF0007068	ORF Predicted by Annotation Working Group	1,50
IPF3651	CAF0007086	ORF Predicted by Annotation Working Group	0,48
CHA12.3f	CAL0002743	Protein similar to serine/threonine dehydratases, catabolic; negatively regulated by Rim101p; expression greater in low iron; regulated on white-opaque switching; filament induced; transposon mutation affects filamentous growth	0,46

MLC1	CAF0006950	Protein with microtubule-dependent localization to the Spitzenkorper, also localizes to cytokinetic ring in hyphae; cell-cycle dependent localization to bud tip (polarisome) and bud neck in yeast and pseudohyphal cells	0,43
CTA1	CAL0000462	Catalase; role in resistance to oxidative stress, including neutrophils, peroxide; role in systemic virulence in mouse; regulated by iron, ciclopirox olamine, fluconazole, growth, oxidative stress, carbon source, pH, Rim101p, Ssn6p	0,29
PGA36	CAL0001488	Putative GPI-anchored protein of unknown function; alkaline upregulated; greater transcription in hyphal form than yeast form; regulated by Nrg1p, Rfg1p, Tup1p; regulated by Tsa1p, Tsa1Bp in minimal media at 37	0,26

TABLA 3: Comparación de los ratios de genes de una cepa silvestre y un mutante *sko1* tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno respecto a las condiciones basales de la cepa silvestre.

NOMBRE	CGDID/ GENEID	FUNCIÓN	CAF2 10' vs CAF2	SKO1 10' vs CAF2
IPF13017	CAL0000965	unknown function	1,47	2,54
RNR21	CAL0002245	ribonucleoside-diphosphate reductase	0,64	2,54
IPF5118	CAL0002102	unknown function	1,44	2,50
IPF3087	CAL0002057	unknown function	1,83	2,39
IPF11466	CAL0000772	unknown function	1,77	2,38
IPF19578	CAL0001255	unknown function	1,56	2,36
ZMS1	CAL0001620	Zinc Finger Protein C2H2 (by homology)	1,35	2,30
IPF5460	CAL0000737	Predicted ORF	2,58	2,21
IPF11756	CAL0001892	unknown function	1,34	2,18
UBP3.3	CAL0001266	Ubiquitin-specific proteinase, 3-prime end	1,88	2,14
ABP1	CAL0003553	actin-binding protein	1,56	2,08
CSP37	CAL0002434	Hyphal cell wall protein; role in progression of mouse systemic infection	0,46	1,99
IPF4430	CAF0006969	Gene induced by hypoxia and ketoconazole; oral infection upregulated; mutants have reduced capacity to damage oral epithelial cells	5,59	1,91
CSH1	CAL0001962	Aldo-keto reductase	0,49	1,46
DCK1	CAL0002646	Putative guanine nucleotide exchange factor	2,64	1,27
DCW1	CAL0002710	Protein with predicted GPI modification	0,48	0,65
IPF5360	CAF0006971	unknown function	0,49	0,65
SMT3	CAL0001089	Ubiquitin-like protein	0,55	0,63
MIS11	CAL0000766	mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase precursor	0,42	0,61
GIN4	CAL0001054	ser/thr protein kinase	0,40	0,59
IPF8724	CAL0000999	unknown function	0,40	0,58
PEX11	CAL0001256	peroxisomal membrane protein - peroxin by homology	0,41	0,56
-	CAL0003112		0,45	0,56
-	CAL0000626		0,31	0,55
LCB2	CAL0001621	Palmitoyl transferase (by homology)	0,47	0,54
IPF6340	CAL0001857	unknown function	0,35	0,54
GIR2	CAL0003315	transposon mutation affects filamentous growth	0,49	0,54

Anexos

CDC43	CAL0001576	geranylgeranyltransferase I	0,43	0,53
LAT1	CAL0003237	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase (by homology)	0,44	0,53
SBP1	CAL0002378	RNA binding protein-like (by homology)	0,66	0,50
ADK1	CAL0004216	Putative adenylate kinase; repressed in hyphae	0,77	0,50
-	CAL0002864		0,45	0,50
HTB1	CAL0000206	Histone H2B (by homology)	0,33	0,50
PGA24	CAL0000321	putative cell wall protein (by homology)	0,20	0,50
PGA24	CAL0000321	putative cell wall protein (by homology)	0,20	0,50
IPF12758.5f	CAL0004747	unknown function	0,57	0,50
EBP4	CAL0004957	NADPH dehydrogenase (by homology)	0,66	0,50
TSC13	CAL0003440	unknown function	0,61	0,50
SHM2	CAL0001464	Serine hydroxymethyltransferase precursor, mitochondrial (by homology)	0,63	0,49
MIG1	CAL0000926	transcriptional regulator	0,58	0,49
SEC62	CAL0001383	subunit of ER protein-translocation complex (by homology)	0,70	0,48
IPF3366	CAL0004723	Mitochondrial ribosomal protein (by homology)	0,85	0,48
SSR1	CAL0002011	Secretory Stress Response protein 1 (by homology)	0,56	0,47
POL3	CAL0002693	Large subunit of DNA polymerase III	0,67	0,47
PMT1	CAL0002654	mannosyltransferase	0,39	0,47
IPF16646	CAL0000962	unknown function	0,59	0,47
FEN11	CAL0001319	Fatty acid elongase required for sphingolipid formation (by homology)	0,43	0,47
CHO1	CAL0001102	Phosphatidylserine synthase	0,55	0,47
SGN11	CAL0003946	unknown function	0,54	0,47
IPF2562	CAL0003980	unknown function	0,59	0,47
DUT1	CAL0004091	dUTP pyrophosphatase	0,62	0,46
TIM17	CAL0003142	Mitochondrial inner membrane import translocase subunit (by homology)	0,62	0,46
-	CAL0003192		0,54	0,45
IPF6878	CAL0000227	unknown function	0,61	0,44
RPS15	CAL0003305	40S ribosomal protein S15, (by homology)	0,82	0,44
ERG13	CAL0004537	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase (by homology)	0,56	0,44
MAK21	CAL0003265	Ribosome biogenesis protein (by homology)	0,64	0,43
GIS2	CAL0002417	Translational activator for mRNAs with internal ribosome entry sites	0,66	0,43
RPB5	CAL0001316	DNA-directed RNA polymerase I, II, III (by homology)	0,56	0,43
PDX1	CAL0001615	Pyruvate dehydrogenase complex protein X (by homology)	0,34	0,43
PTR21	CAL0000244	peptide transporter	0,60	0,43
FAS2.3f	CAL0003358	fatty-acyl-CoA synthase, alpha chain, 3-prime end	0,27	0,43
HIS3	CAL0003242	imidazole glycerol phosphate dehydratase	0,70	0,42
SUR2	CAL0002282	Hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide by homology	0,54	0,42
HYM1	CAL0002027	Protein of RAM cell wall integrity signaling network	0,64	0,41
GPX2	CAL0000682	glutathione peroxidase (by homology)	0,65	0,41
CYB5	CAL0002061	Cytochrome b5 (by homology)	0,52	0,37
SAM2	CAL0001034	S-adenosylmethionine synthetase 2	0,66	0,36
GAP5	CAL0001876	General amino acid permease (by homology)	0,26	0,35
IPF19154	CAL0001924	unknown function	0,64	0,30

<i>ILV3</i>	CAL0004803	dihydroxyacid dehydratase (by homology)	0,72	0,30
<i>IPF17975</i>	CAL0003604	unknown function	0,51	0,29
<i>IPF3833</i>	CAL0004116	unknown function	0,26	0,29
<i>ZSF1</i>	CAL0004295	a mRNA-binding protein; transcription regulated by yeast-hyphal switch	0,51	0,29
<i>MNT2</i>	CAL0000069	Alpha-1,2-mannosyltransferase (by homology)	0,27	0,28
<i>TOS1</i>	CAL0000187	putative Anchor subunit of a-agglutinin (by homology)	0,52	0,27

2. Anexo II: Publicaciones generadas a partir de este trabajo

1. Urrialde,V., Prieto,D., Pla,J., and Alonso-Monge,R. (2015) The Pho4 transcription factor mediates the response to arsenate and arsenite in *Candida albicans*. *Front Microbiol* **6**: 118.

2. Alonso-Monge,R., Román,E., Arana,D.M., Prieto,D., Urrialde,V., Nombela,C., and Pla,J. (2010) The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 587-601.



The Pho4 transcription factor mediates the response to arsenate and arsenite in *Candida albicans*

Verónica Urrialde, Daniel Prieto, Jesús Pla and Rebeca Alonso-Monge *

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Edited by:

Helio K. Takahashi, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Leonardo Nimrichter, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil
Ian A. Cleary, University of Tennessee at Martin, USA
Eleonora Kurtenbach, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

*Correspondence:

Rebeca Alonso-Monge,
Departamento de Microbiología II,
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, E-28040 Madrid, Spain
e-mail: realonso@farm.ucm.es

Arsenate (As (V)) is the dominant form of the toxic metalloid arsenic (As). Microorganisms have consequently developed mechanisms to detoxify and tolerate this kind of compounds. In the present work, we have explored the arsenate sensing and signaling mechanisms in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Although mutants impaired in the Hog1 or Mkc1-mediated pathways did not show significant sensitivity to this compound, both Hog1 and Mkc1 became phosphorylated upon addition of sodium arsenate to growing cells. Hog1 phosphorylation upon arsenate challenge was shown to be Ssk1-dependent. A screening designed for the identification of transcription factors involved in the arsenate response identified Pho4, a transcription factor of the myc-family, as *pho4* mutants were susceptible to As (V). The expression of *PHO4* was shortly induced in the presence of sodium arsenate in a Hog1-independent manner. Pho4 level affects Hog1 phosphorylation upon As (V) challenge, suggesting an indirect relationship between Pho4 activity and signaling in *C. albicans*. Pho4 also mediates the response to arsenite as revealed by the fact that *pho4* defective mutants are sensitive to arsenite and Pho4 becomes phosphorylated upon sodium arsenite addition. Arsenite also triggers Hog1 phosphorylation by a process that is, in this case, independent of the Ssk1 kinase. These results indicate that the HOG pathway mediates the response to arsenate and arsenite in *C. albicans* and that the Pho4 transcription factor can differentiate among As (III), As (V) and P_i , triggering presumably specific responses.

Keywords: *Candida albicans*, stress response, transcription factor, oxidative stress, arsenate, arsenite, MAPK, signaling

INTRODUCTION

Arsenic (As) is a metalloid widespread in nature. As occurs with others metalloids, it is toxic and the exposure to it is associated with a variety of diseases in humans, including immunological disorders (reviewed by Flora, 2011). Several compounds containing As are classified as human carcinogens according to the International Agency for Cancer Research. Arsenic can be found in the environment in two main forms: arsenate (As (V)) and arsenite (As (III)). Both prokaryotic and eukaryotic cells have developed mechanisms to take up and detoxify these compounds (Rosen, 2002), the oxidation state being essential for the type of transporter used in this process.

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been considered as a trustworthy model to unravel the molecular details of metal action and their corresponding detoxification strategies (reviewed by Wysocki and Tamas, 2010). Arsenite enters the cell through the aquaglycerolporin, encoded by *FPS1* (Wysocki et al., 2001; Maciaszczyk-Dziubinska et al., 2010), in *S. cerevisiae* hexose permeases have been also involved in this process (Liu et al., 2004). Fps1 is a bidirectional channel than can also mediate the metalloid's efflux (Bienert et al., 2008). Arsenite is exported from

the cytoplasm through the membrane Acr3/Arr3 transporters or transported into the vacuole as a glutathione-conjugated substrate by the Ycf1 ABC-transporter (Wysocki et al., 1997). The expression of these genes is regulated by the transcription factors Arr1 (also called Yap8) and Yap1. Yap1 also prevents oxidative damage in cells exposed to these compounds, by inducing target genes that remove ROS (Reactive Oxygen Species) generated by arsenic compounds (Menezes et al., 2008). Arsenate is a structural analog of inorganic phosphate (P_i) and can easily enter the cell through phosphate transporters. Phosphate and arsenate can be imported into the fungal cell by Pho84 and Pho89 (two-high affinity permeases) and Pho87 and Pho90 (two low affinity permeases) (reviewed by Wysocki and Tamas, 2010). In the presence of arsenate, Arr2, an arsenate reductase, reduces arsenate to arsenite which is then removed from the cytoplasm either through Arr3 or Ycf1 (Tamas and Wysocki, 2001; Rosen, 2002).

In order to generate a detoxifying response, cells first have to sense the presence of toxic compounds. Signal transduction pathways mediated by MAP kinases are conserved mechanisms that allow cells sensing and responding to environmental stimuli (Kultz, 1998). These pathways included the MAPK module which is integrated by three protein kinases. These MAP kinases become sequentially activated by phosphorylation and control the expression of proper genes through different transcription factors.

Abbreviations: As (V), arsenate as Na_2HAsO_4 (sodium arsenate); As (III), as NaAsO_2 (sodium arsenite); P_i , inorganic phosphate.



The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*

Rebeca Alonso-Monge, Elvira Román, David M. Arana, Daniel Prieto, Verónica Urrialde, César Nombela, Jesús Pla*

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2009

Accepted 29 March 2010

Available online 11 April 2010

Keywords:

Candida albicans

Dimorphism

MAP kinase pathway

Transcription factor

Oxidative stress

ABSTRACT

Cells respond to environmental changes triggering adaptive responses which are, in part, mediated by a transcriptional response. These responses are complex and are dependent on different transcription factors. The present work reports the implication of the Sko1 protein in several processes relevant to the physiology of *Candida albicans*. First, Sko1 acts as transcriptional repressor of genes involved in pathogenesis and hyphal formation, which results in increased expression of the hyphal related genes *ECE1* and *HWP1* without significant changes in the virulence using a mouse model of systemic infection. Second Sko1 is involved in the response to oxidative stress and *sko1* mutants increase the sensitivity of *hog1* to the myelomonocytic cell line HL-60. Genome-wide transcriptional analysis after hydrogen peroxide treatment revealed that *sko1* mutants were able to generate an adaptive response similar to wild type strains, although important differences were detected in the magnitude of the transcriptional response. Collectively, these results implicate Sko1 as an important mediator of the oxidative stress response in *C. albicans*.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cells are frequently exposed to environmental stress. Under these non optimal conditions, the generation of a proper adaptive response is necessary to guarantee survival. When yeast cells are exposed to mild osmotic stress, they undergo a response which is accomplished, at least in part, by the HOG (high osmolarity glycerol) MAP kinase cascade (Brewster et al., 1993). In *Saccharomyces cerevisiae*, this route is activated by two upstream branches (Banuett, 1998; Gustin et al., 1998; Posas et al., 1998a). The first one depends on the transmembrane protein Sln1, whose basal autophosphorylation activates Ypd1 and Ssk1 (Posas et al., 1996; Tao et al., 2002) and prevents activation of the Hog1 MAP kinase. Under osmotic stress, unphosphorylated Ssk1 leads to phosphorylated Ssk2/Ssk22 that activates the Pbs2 MAPK kinase (MAP kinase kinase) (Boguslawski, 1992) and the Hog1 protein (Brewster et al., 1993). A second input comes from the Sho1, Cdc42, Ste20/Ste50 and Ste11 (the MAP kinase kinase kinase) proteins that also lead to activation of Pbs2 (O'Rourke and Herskowitz, 1998; Posas et al., 1998a,b; Raitt et al., 2000). The Sho1 transmembrane protein is responsible for attaching this complex to regions more vulnerable to osmotic stress.

It has become recently clear that the HOG pathway is also important for oxidative stress resistance in *S. cerevisiae* (see Ikner and Shiozaki (2005) for a review of the role of MAPK pathways in oxidative defense mechanisms). Although initial studies reported that Hog1 was not responsive to hydrogen peroxide (Schüller et al., 1994). It was later shown that Hog1 is indeed activated in response to certain oxidants (Singh, 2000; Haghnazari and Heyer, 2004; Bilsland et al., 2004). Reinforcing these data, mutants altered in the HOG pathway are more sensitive to oxidants (Singh, 2000; Rep et al., 2001). The yeast response to oxidative stress is, at least in part, developed at the transcription level. Some genes like *YAP1* (Harshman et al., 1988), *YAP2* (Bossier et al., 1993; Stephen et al., 1995), *MSN2/MSN4* (Kobayashi and McEntee, 1993; Estruch and Carlson, 1993), *SKN7* (Krems et al., 1996; Morgan et al., 1997; Lee et al., 1999) or *SKO1* (Rep et al., 2001) among others (see Moye-Rowley (2002) for a review) participate in the induction of oxidative defense mechanisms. Sko1 has been shown to mediate the recruitment of the Tup1–Ssn6/Cyc8 complex to the promoter regions of certain *HOG1*-dependent genes (Proft and Serrano, 1999; Proft et al., 2001). Phosphorylation of Sko1 occurs in response to osmotic stress at multiple sites within the N-terminal region (Proft et al., 2001); this converts the Sko1–Cyc8–Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF allowing the expression of target genes (Proft and Struhl, 2002). Deletion of *SKO1* also modifies the induction of certain oxidative stress responsive genes, therefore establishing a link between Sko1 and

Abbreviations: MAP kinase, mitogen activated protein kinase.

* Corresponding author. Fax: +34 91 3941745.

E-mail address: jesuspla@farm.ucm.es (J. Pla).

